



TITLE:

イネ科植物と病原菌の相互作用に  
関わる化学物質の研究(  
Dissertation\_全文)

AUTHOR(S):

宮川, 恒

---

CITATION:

宮川, 恒. イネ科植物と病原菌の相互作用に関わる化学物質の研究. 京都大学, 1995, 博士(農学)

ISSUE DATE:

1995-03-23

URL:

<https://doi.org/10.11501/3080999>

RIGHT:

新 制
農
702

京大附図

# イネ科植物と病原菌の相互作用に 関わる化学物質の研究

宮 川 恒

1995

# イネ科植物と病原菌の相互作用に 関わる化学物質の研究

宮 川 恒

1995

## 目次

第1章 序論	1
第2章 植物病原菌 <i>Bipolaris bicolor</i> が生産する植物毒素	5
2-1 緒言	5
2-2 植物毒素の単離と構造決定	7
2-3 植物毒性	28
2-4 考察	28
2-5 実験の部	30
第3章 オオムギにおけるうどんこ病抵抗性関連物質	33
3-1 緒言	33
3-2 抗菌性ストレス物質の検索と同定	34
3-3 蛍光性ストレス物質の検索と同定	38
3-4 ストレス物質の生成量の分析	41
3-5 ストレス物質のうどんこ病菌に対する抗菌性	43
3-6 考察	44
3-7 実験の部	47
第4章 エンバクのファイトアレキシンの再検討	49
4-1 緒言	49
4-2 結果	52
4-3 考察	62
4-4 実験の部	63
第5章 エンバクにファイトアレキシンを誘導するエリシターとその作用	67
5-1 緒言	67
5-2 エリシターの検索	68
5-3 エリシター処理によるavenanthramide類の誘導	71
5-4 Victorinおよび銀イオンにより特徴的に誘導される化合物の同定	74

5-5 エリシターによる細胞膜機能傷害とファイトアレキシン 誘導活性 .....	78
5-6 キチンオリゴマーのエリシター活性 .....	82
5-7 考察 .....	84
5-8 実験の部 .....	88
第6章 まとめ .....	93
引用文献 .....	95

謝辞

## 第1章 序論

農作物に甚大な被害をもたらす植物病は、人類の歴史上、常に大きな脅威であった。そして今日でも依然として、いかにその被害を防ぐかが強い関心の対象となり、またそのために大きな努力が払われていることに変わりはない。しかし、このように植物に寄生して病害をもたらす微生物は、地球上のほとんど無数とも言える微生物のうちのごく一部に限られており、大部分は植物病とは無関係である。では、それらの植物への感染の成立・不成立はどのように決定されるのか？

自然界で絶えず多くの微生物との接触に身をさらしている植物は、多様な防御機構を備えてこれに対処している。この防御機構は、物理的なものと、化学的なものに大別できる。物理的な防御は、植物の表層や細胞壁に存在する高分子成分に由来し、これらは侵入を試みる微生物に対し、文字どおり物理的障壁として機能すると考えられている。一方、化学的防御は、微生物に対して有毒な低分子化合物成分によるものである。いずれの防御も、先在性のものと、感染に応じて誘導されるものの二段構えになっていて、前者は主に非病原性の微生物に対する抵抗性に寄与するのに対し、後者は前者の防御を打ち破って侵入する病原性微生物に対する抵抗性に重要な役割を果たすと考えられる。これらのうち、誘導性の化学防御を担う「ファイトアレキシン」と呼ばれる抗菌性物質<sup>1-4)</sup>は、感染部位周辺に有効に蓄積して、病原の植物体内での発育を阻止する直接的な要因となっていると考えられており、実際にその動態が詳しく解析されて、その蓄積能と病害抵抗性との間に良好な相関が認められる例がいくつか示されている。<sup>5-9)</sup> 現在では、20科100種以上の植物でファイトアレキシンの産生がみられているが、このファイトア

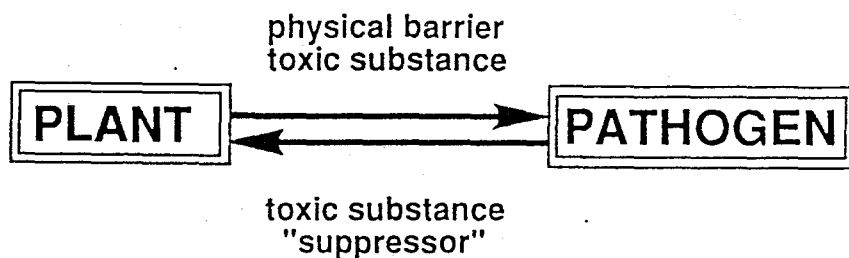


図1-1 植物と病原菌の相互作用

レキシンによる防御は、動物における免疫機構とも対比でき、病原の認識から誘導に至る過程は病理学的のみならず、植物生理、生化学的にも注目されている。

このような防御に対し、病原微生物側はそれをなんとかくぐりぬけ、植物体上での寄生を可能にしようと試みる。このための戦略にも、化学物質が大きく関わっている。例えば、病原微生物は植物の代謝を攪乱するような「毒性物質」を生産し、先に述べた誘導性の抵抗反応を正常に発動させなくして、感染を成功させようとする。このような化学因子のうち最も興味深いのは、いくつかの病原菌が生産する「宿主特異的毒素」<sup>10)</sup>と呼ばれる物質であろう。この毒素の毒性は宿主植物に対してのみ選択的に発現され、単一の因子で病原性と宿主を同時に決定するので、植物病の成立を分子レベルで解析する格好のプロープとなっている。またこれに比べてより「ソフト」な戦略として、植物にあらかじめダメージを与えるのではなく、異物認識だけを阻害して抵抗反応の誘導を遅らせ、感染を成功させる場合もあると考えられる。とくに絶対寄生菌と呼ばれる菌類がもたらす疾病のように、初期に植物組織の顕著な変性がみられないものでは、そのような戦略が採られている可能性が高いと思われる。「サプレッサー」と概念的に命名されたこの認識阻害に関与する物質については、未だ化学的に同定された例が少ないが、近年、エンドウ褐紋病菌においてその実体が初めて明らかにされ<sup>11)</sup>、この知見をもとに他の系での研究の進展が大いに期待されている。

以上述べたような、化学物質を介した植物と病原微生物との間の攻防のバランスがどちらに傾くか。これが疾病の成立を大きく左右する。これまでに種々の系で、植物-微生物間の相互作用について、その鍵となっている化学物質が明らかにされ、その生成の機序や制御の機構の検討を通じて、植物病の成立過程について多くの重要な知見が得られてきた。しかしながら、農業上重要な作物を多く含むイネ科植物についての研究例は一部を除いて未だ数少なく、植物側の病原の認識やその情報伝達機構ならびに病原側の病原性決定因子について十分な情報が得られていないのが現状である。本研究は、このような状況をふまえて、イネ科植物の①糸状菌 *Bipolaris bicolor* によりもたらされる葉枯病、②オオムギのうどんこ病および③エンバクの冠さび病の3種の疾病を事例に植物病原微生物の宿主への感染成立あるいは不成立に関わる化学物質につき検討を加えたものである。それぞれで明らかにできた

ことを、以下の章で順次述べる。

なお、本研究で使用した分析機器は次のとおりである。旋光度は日本分光製DIP-4デジタル旋光度計で測定した。紫外吸収スペクトル (UV) はBeckman製DU-64分光光度計で測定した。赤外吸収スペクトルは島津製作所製IR-400分光光度計で測定した。電子衝撃イオン化質量スペクトル (EI-MS) は、日立製作所製M-80二重収束型質量分析計を用いイオン化電圧70eVで測定した。サーモスプレー液体クロマトグラフィー質量スペクトル (LC-MS) は、島津製作所製LCMS-QP1000質量分析計によって測定した。プロトン ( $^1\text{H}$ -) および炭素 ( $^{13}\text{C}$ -) 核磁気共鳴スペクトル (NMR) は、日本電子製FX-90Q (90MHz), 同GX-400 (400MHz), BRUKER製AC-300 (300MHz) および同ARX-500 (500MHz) で測定した。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) には、それぞれUV検出器を備えた日立製作所製655型および島津製作所製LC-10AS型を用いた。蛍光検出を行う際は、これに日立製作所製F-1050型検出器を接続して用いた。



## 第2章 植物病原菌 *Bipolaris bicolor* が生産する植物毒素

### 2-1 緒言

これまでに多くの植物病原菌が宿主植物に対して毒性を示す代謝物を生産することが観察されて来た。なかでも、宿主特異的毒素 (Host Specific Toxin: HST) とよばれる毒素が、その極めて高い選択的な植物毒性によって、病原菌の病原性のみならずその宿主をも決定する化学因子として病理学的に注目されていることは前節で述べたとおりである。

イネ科植物の病害に関与するHSTとしては、これまでにHC毒素 (トウモロコシ北方斑点病)<sup>1,2)</sup>、HV毒素 (エンバクビクトリア葉枯病)<sup>1,3)</sup>、HMT毒素 (トウモロコシTレースごま葉枯病)<sup>1,4)</sup>、PM毒素 (トウモロコシyellow leaf

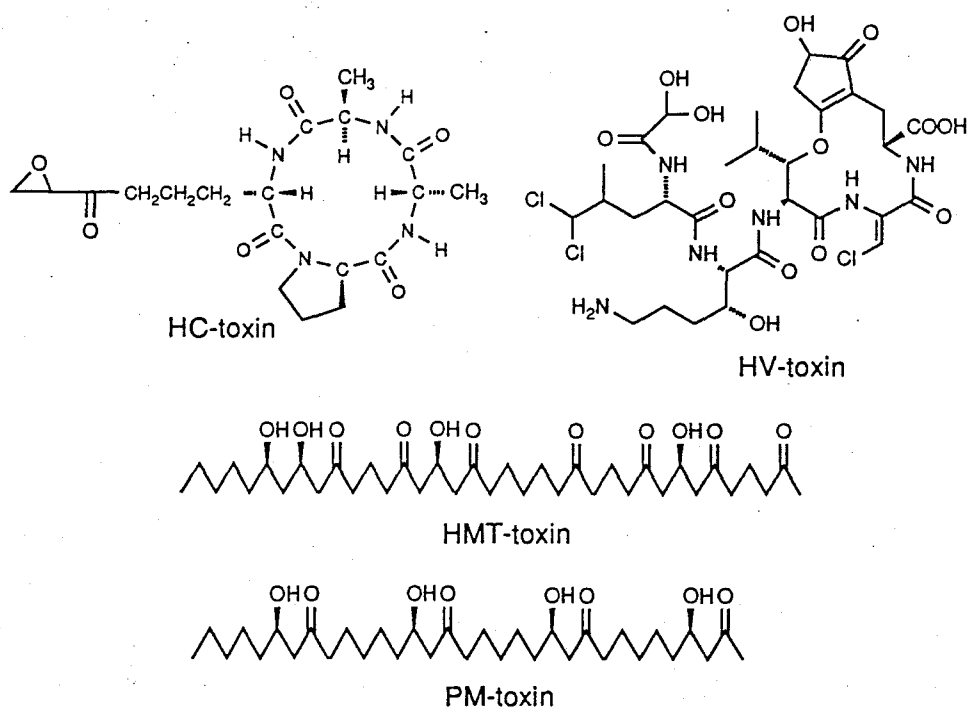


図2-1 イネ科植物病原菌が生産する宿主特異的毒素

blight)<sup>15)</sup>の4毒素が知られている(図2-1)。これらの毒素活性はいずれも宿主植物の特定の品種のみに発現するが、そのような選択性発現の機構は目下分子レベルで精力的に解析されており、植物側の毒素結合部位や作用部位が明らかにされつつある。<sup>16)</sup> このほか、HSTほど病理学的な意義は明らかではないものの、イネ科植物の病原菌から宿主に対して毒性を示すさまざまな代謝物が得られている。その代表的なものを図2-2に示す。これらはいずれも病斑形成型の病原菌から得られたもので、単離した毒素は病徴と同様の褐変を植物組織上に引き起こし、疾病の発生に何らかの役割を果たしているものと推察される。

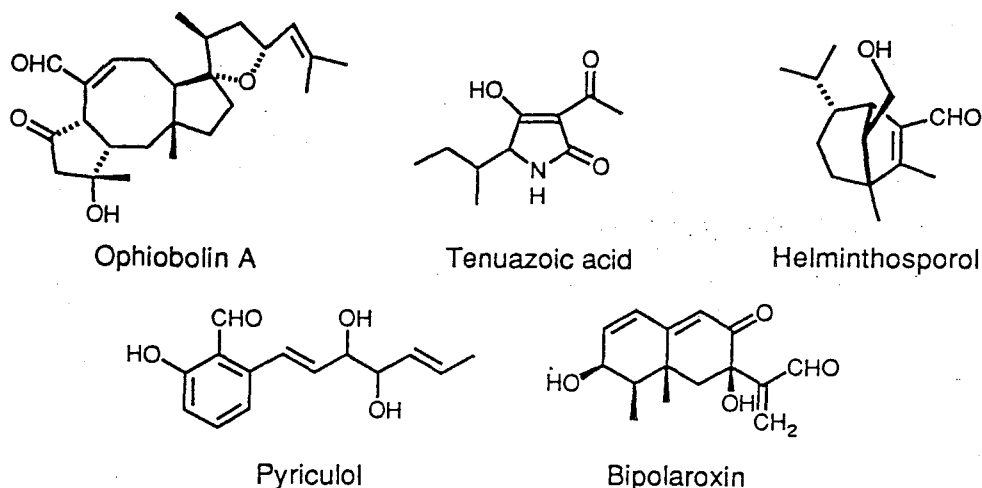


図2-2 イネ科植物病原菌が生産する非特異的毒素

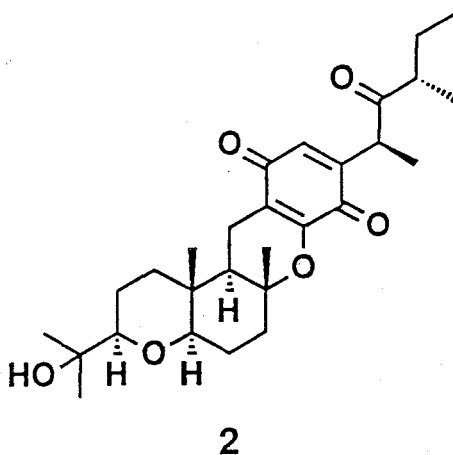
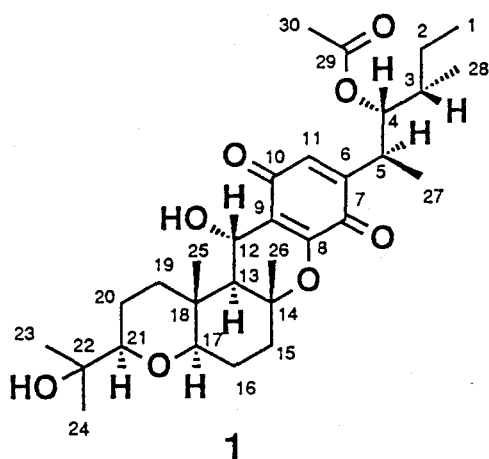
以上のような病理学的な意義に加えて、植物病原菌由来の毒素研究には除草剤あるいは植物生長調節剤の開発につながる基礎的な知見を与えるものとしての期待がかかる。すなわち古くはイネ馬鹿苗病菌の生産する毒素として発見されたジベレリンが、その後植物生理の解明に大きく寄与したことに見られるように、上述のような毒素がイネ科を含む種々の植物の未知の生理機能を明らかにし、その結果露見した植物の弱点が新しい除草剤のターゲットとなることはおおいに予想されることである。とくにHSTの宿主植物に対する特異的な毒性の根拠となる作用部位は、選択的な除草活性を有する薬剤のデザインを行う上での重要な示唆を与えるものと考えられる。このような観点から実際に、雑草に疾病をもたらす植物病原菌の生産する毒素に有用作物-雑草間の選択性除草剤のモデル化合物を求めようとする研究が行われてい

る。

本研究で用いた *Bipolaris bicolor* は複数のイネ科植物に葉枯病を起こす多犯性の糸状菌である。先に述べたように葉枯病などの病斑を形成するタイプの病原菌が数々の興味深い植物毒素を生産することを考慮すると、同菌の代謝物についてもその病原性あるいは病徴発現に重要な役割を演ずる毒素が見いだされることが期待される。用いた病原菌の多犯性からみて、その毒素はイネ科のかかなり広い範囲の植物種に毒性を示すことが予想されるが、逆にそれがイネ科のみに選択的な毒性を示し広葉植物には無害であるか否かはその作用をもたらす化学構造ともども非常に興味深いところである。本節ではそのような植物毒素を求めて同菌の培養代謝物中に宿主の生育を阻害する成分の検索をおこなった結果について述べる。

## 2-2 植物毒素の単離と構造決定

実験に用いた *Bipolaris bicolor* El-1 株はジャガイモ—しょ糖—寒天培地上で 24℃、14 日間培養した。培養後菌体および培地をアセトンで抽出し、シコクビエ幼苗の生育阻害を指標に毒性成分を液—液分配、シリカゲルカラムクロマトグラフィーおよび HPLC により精製し、4 種の毒素 1 - 4 を得た。



毒素 1 はMSおよびNMRスペクトル分析からその分子式を $C_{30}H_{44}O_8$ と決定し、各種物理化学データの比較により *Cochliobolus miyabeyanus* (*Bipolaris oryzae*の完全世代) の黄色色素として報告されている cochlioquinone A<sup>17-19)</sup> と同定した。Cochlioquinone Aはまた、サヤヌカグサ (*Leersia virginica*) の病原菌 *Helminthosporium leersi* からのも得られている。<sup>20)</sup>

毒素 2 は高分解能MSから分子式を $C_{28}H_{40}O_6$ と決定し、これをもとに検索を行って物理化学データを比較した結果、1と同じく *Cochliobolus miyabeyanus* の黄色色素として得られている cochlioquinone B<sup>17-19)</sup> と同定した。

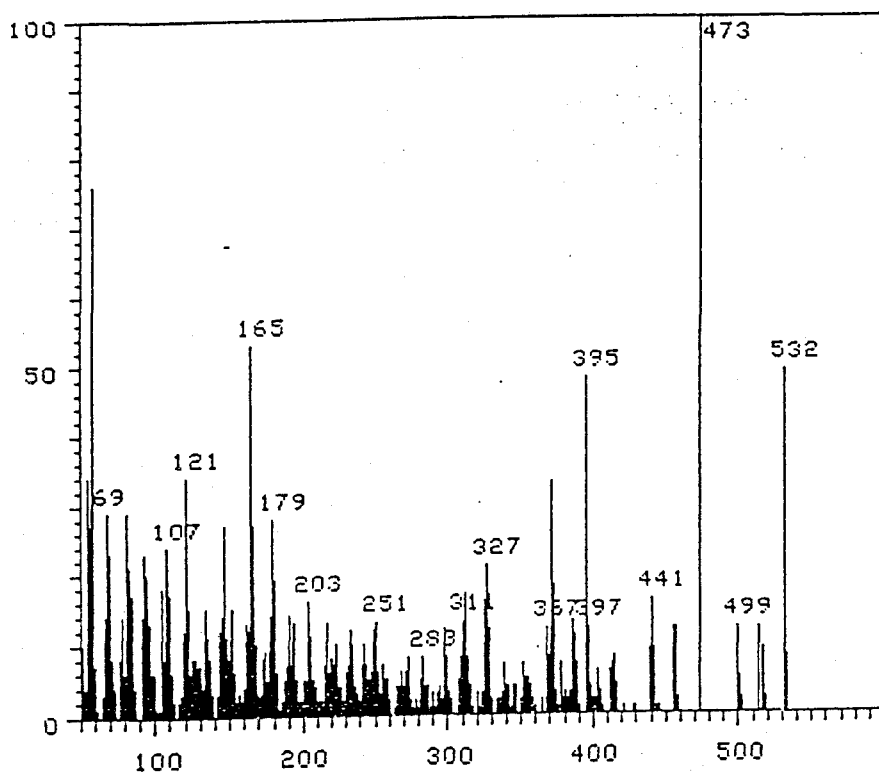


図2-3 毒素 1 のEI-MSスペクトル

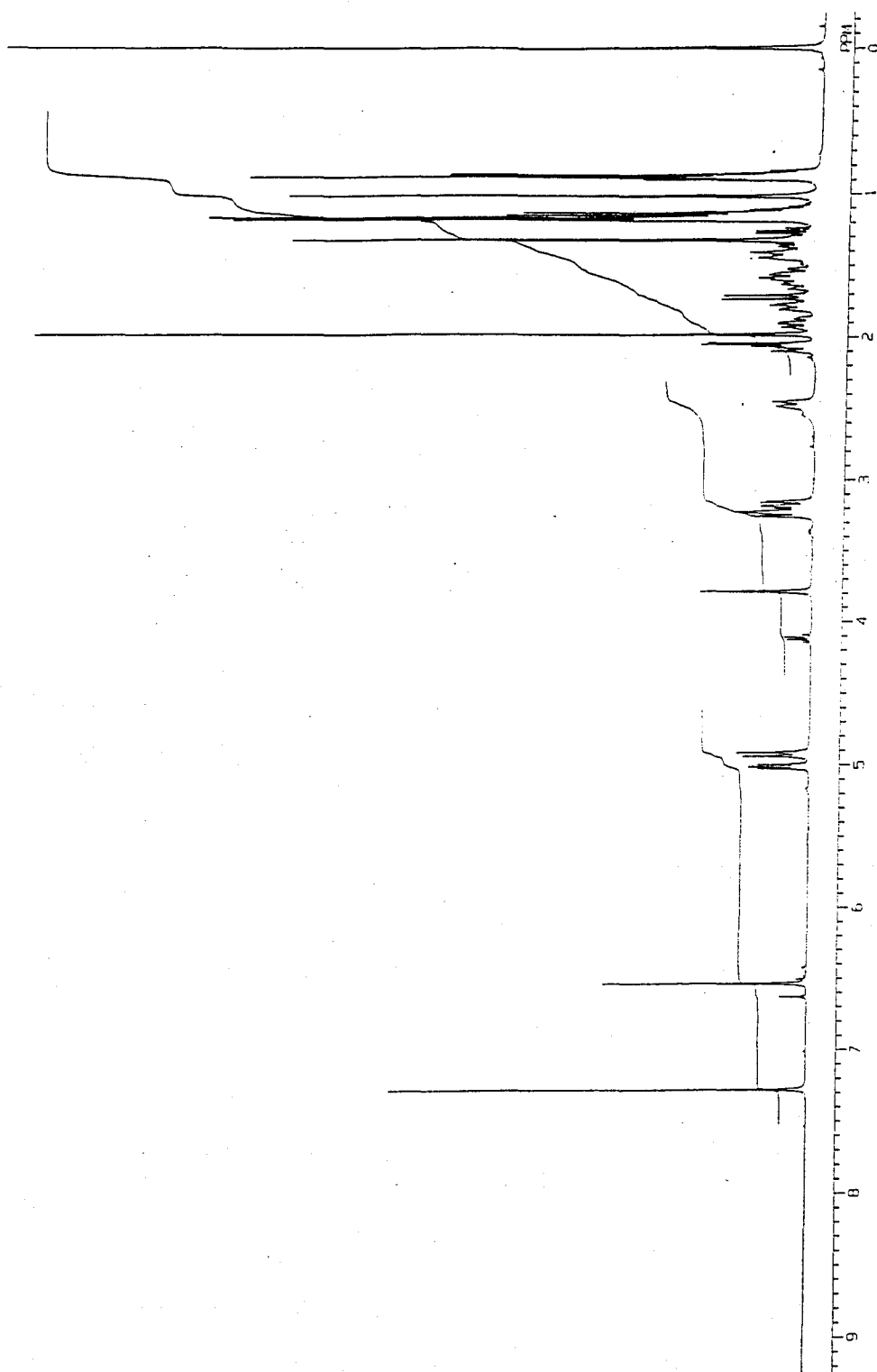


図2-4 毒素 1 の $^1\text{H}$ -NMRスペクトル

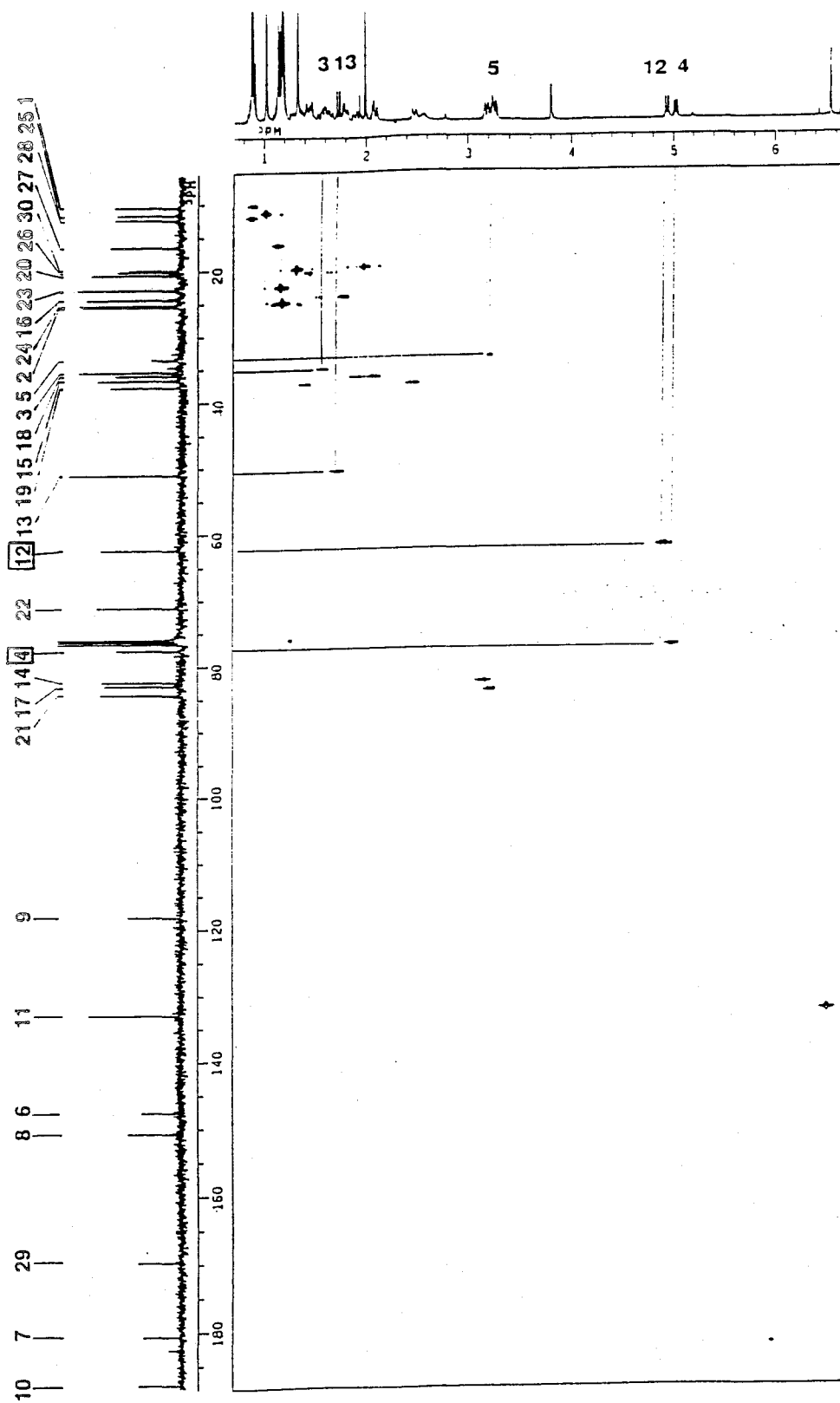


図2-5 毒素 1 のC- $\text{H}$  COSYスペクトル

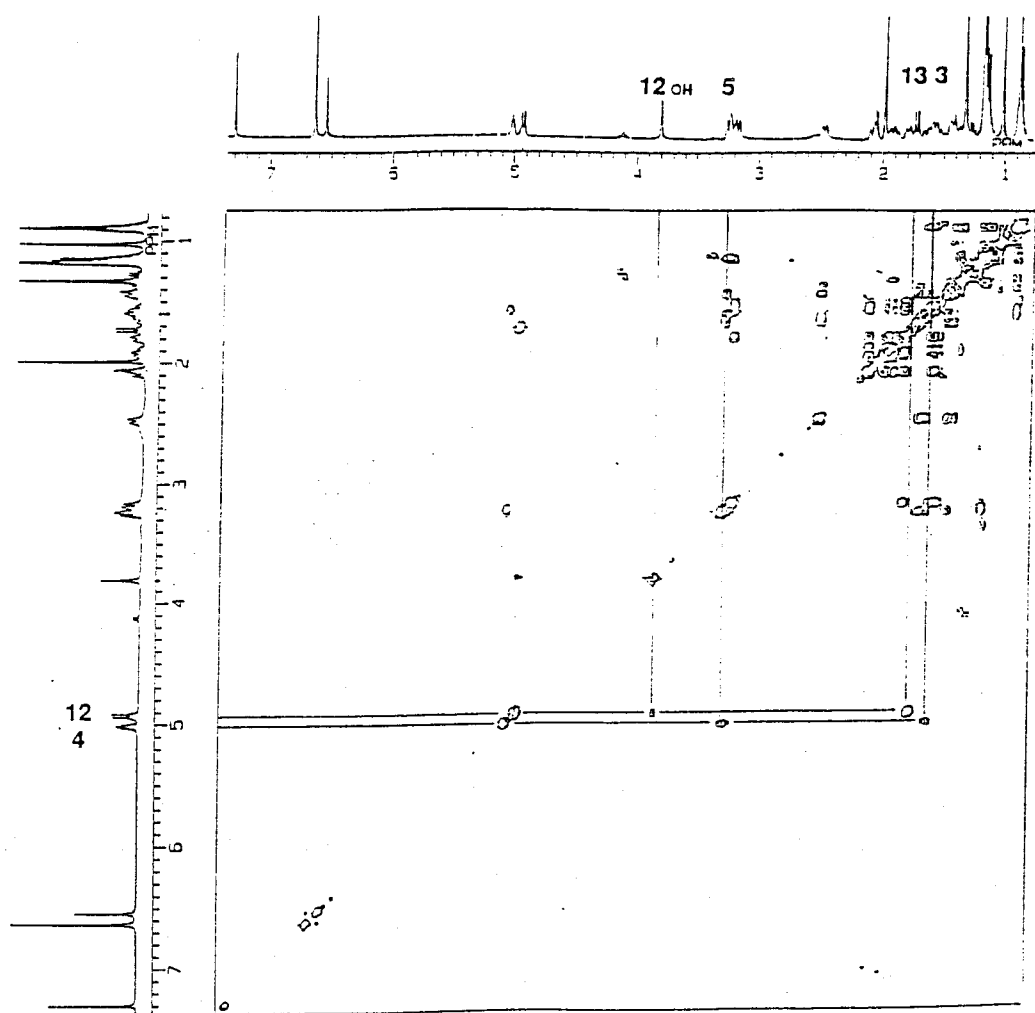


図2-6 毒素 1 のH-H COSYスペクトル

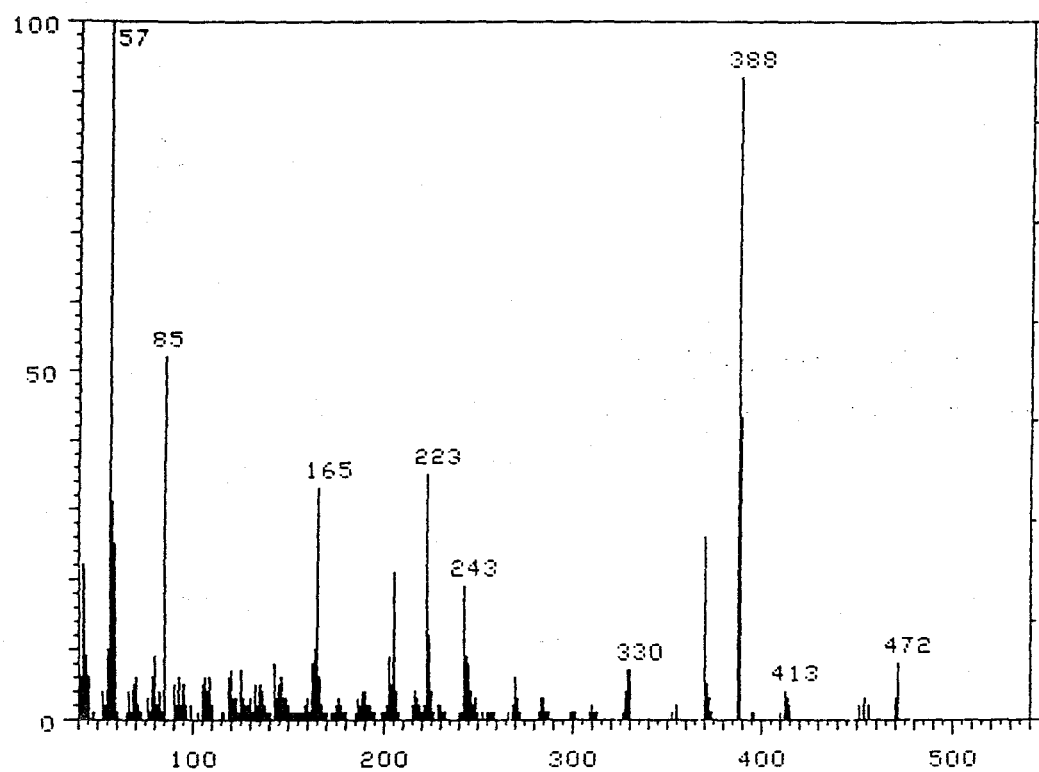


図2-7. 毒素 2 のEI-MSスペクトル



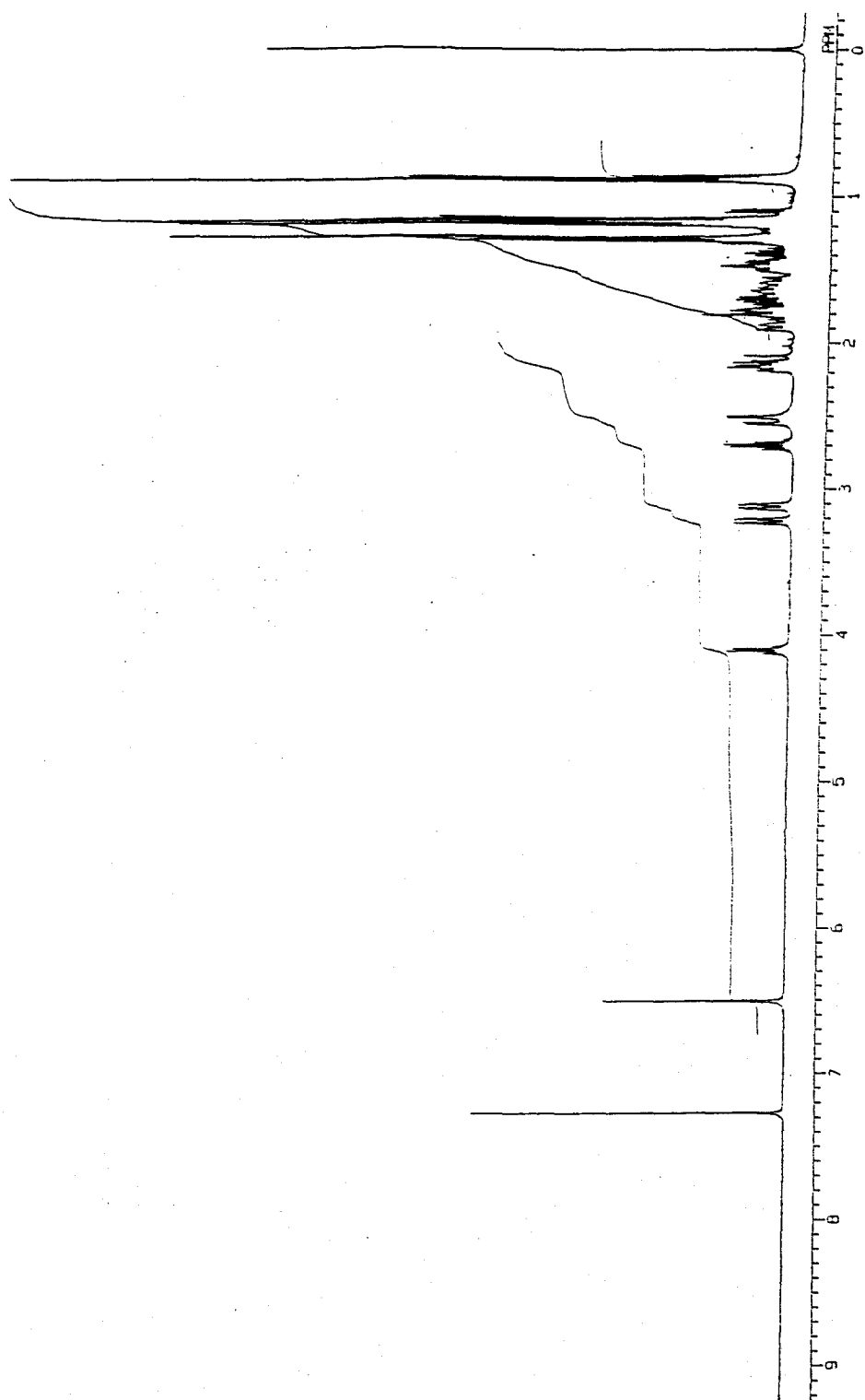


図12-8 毒素 2 の  $^1\text{H}$  NMR スペクトル

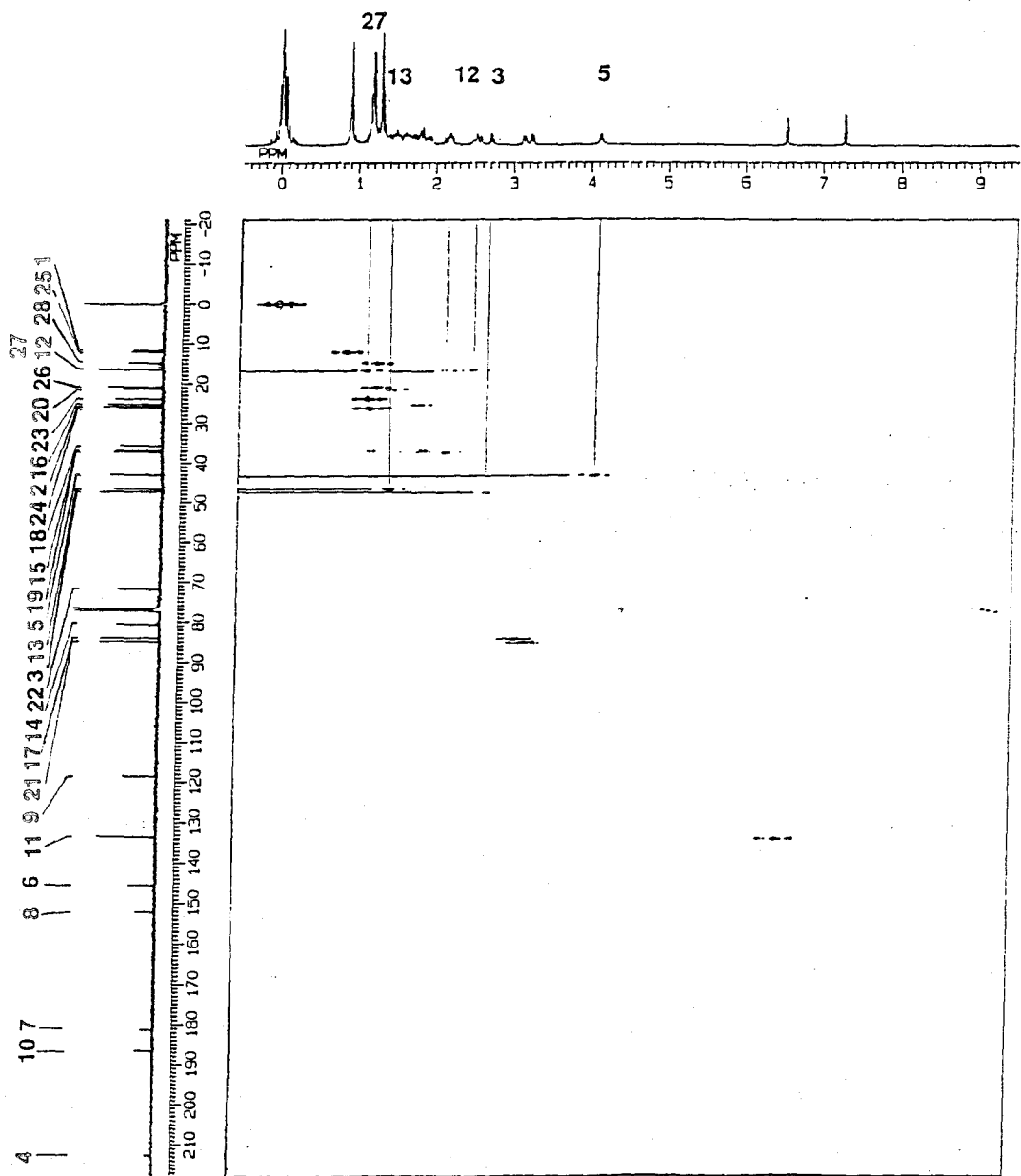
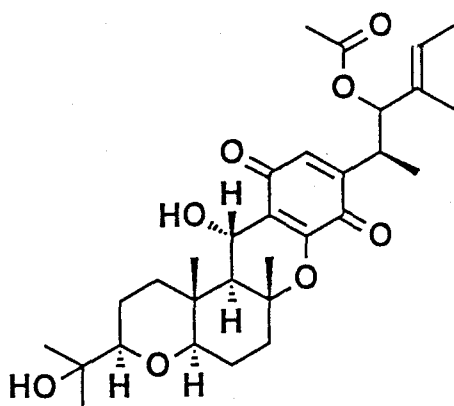


図2-9 毒素 2 のC-H COSYスペクトル

毒素 3 は、EI-MS分析において 1 より2マス少ない $m/z$ 530に分子イオンを与えた。また観測された $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトルは 1 とよく似ており、相違点を解析した結果、3 では 1 の2および3位に相当する炭素のシグナルがオレフィン領域にまで低磁場シフトしていることがわかった。またこれに伴って1, 4 および28位に相当するシグナルについても低磁場シフトが認められた。以上の知見から 3 は 1 の2および3位に関するオレフィン誘導体であるstemphoneであると推定された。Stemphoneはクローバーの病原菌*Stemphylium sarcineaeforme*が生産する黄色色素として報告されており<sup>21, 22)</sup>、3 のUV, IRおよび比旋光度などのデータは文献値とよく一致した。 $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトルデータについては文献に全データの記載がないものの矛盾は見られず推定を支持し、さらに13位と17位、13位と21位、12位と25位および12位と26位のプロトンに相当するシグナルの間にNOEが観測されたことから、立体化学についてもstemphoneと同じであると考えられた。以上より 3 をstemphoneと同定した。



3

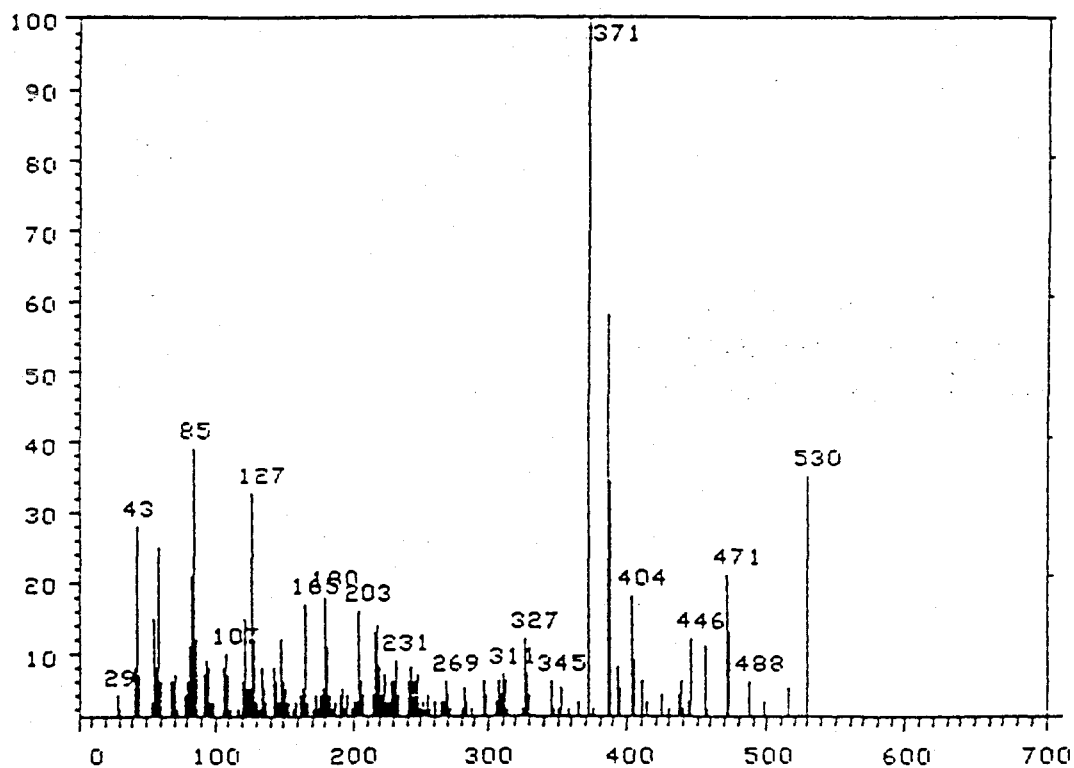


図2-10 毒素 3 のEI-MSスペクトル

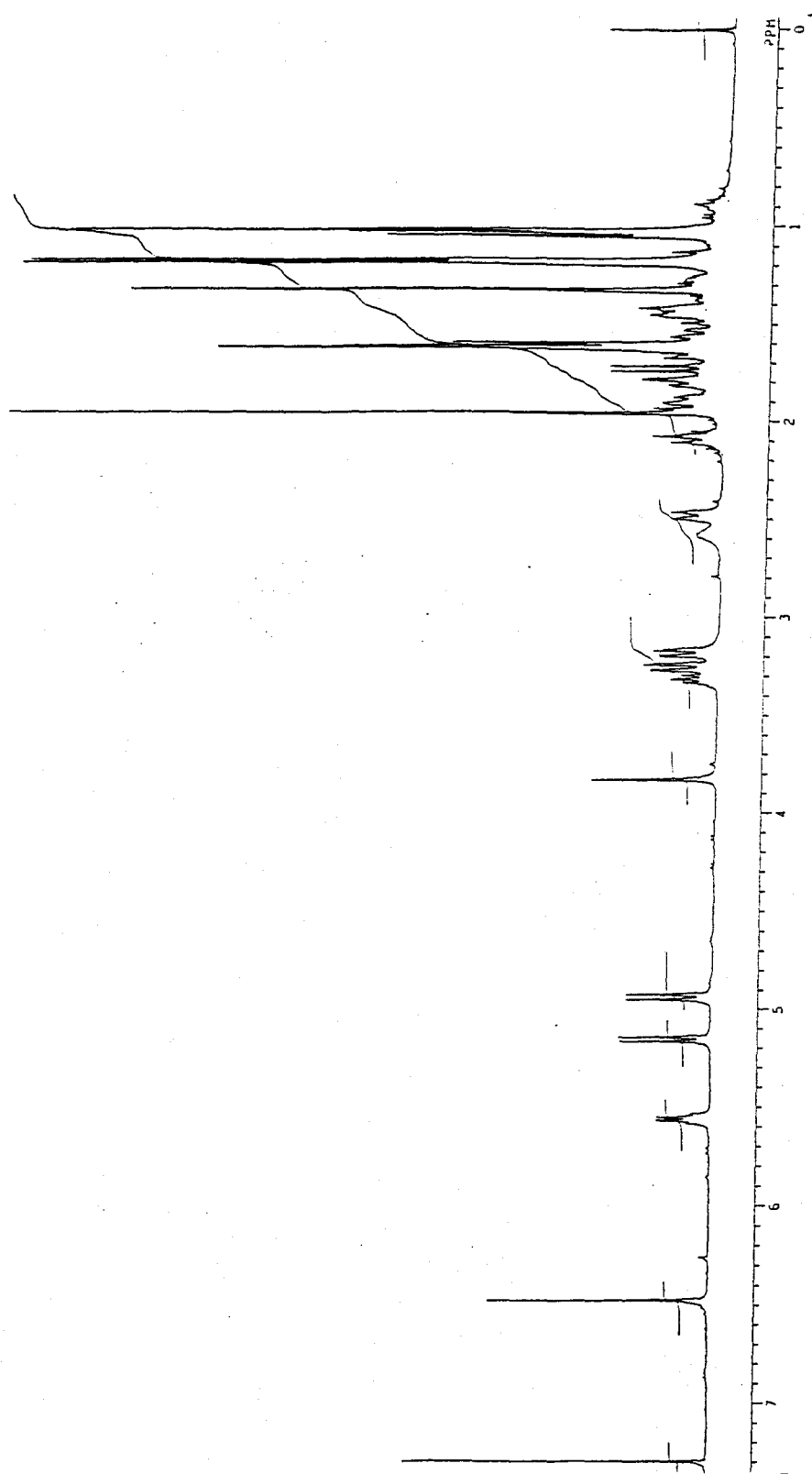


図2-11 毒素 3 の $^1\text{H}$ -NMRスペクトル

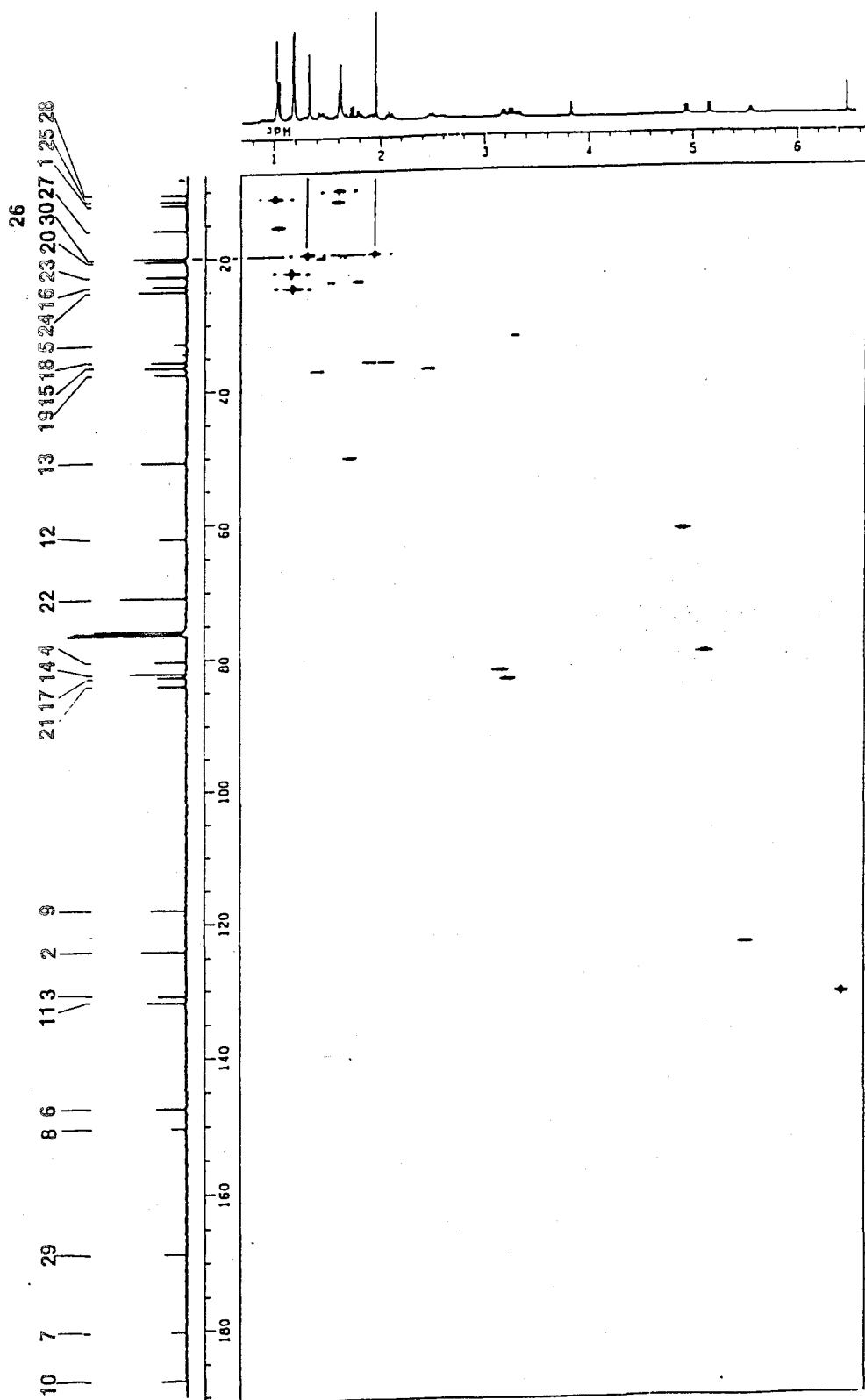
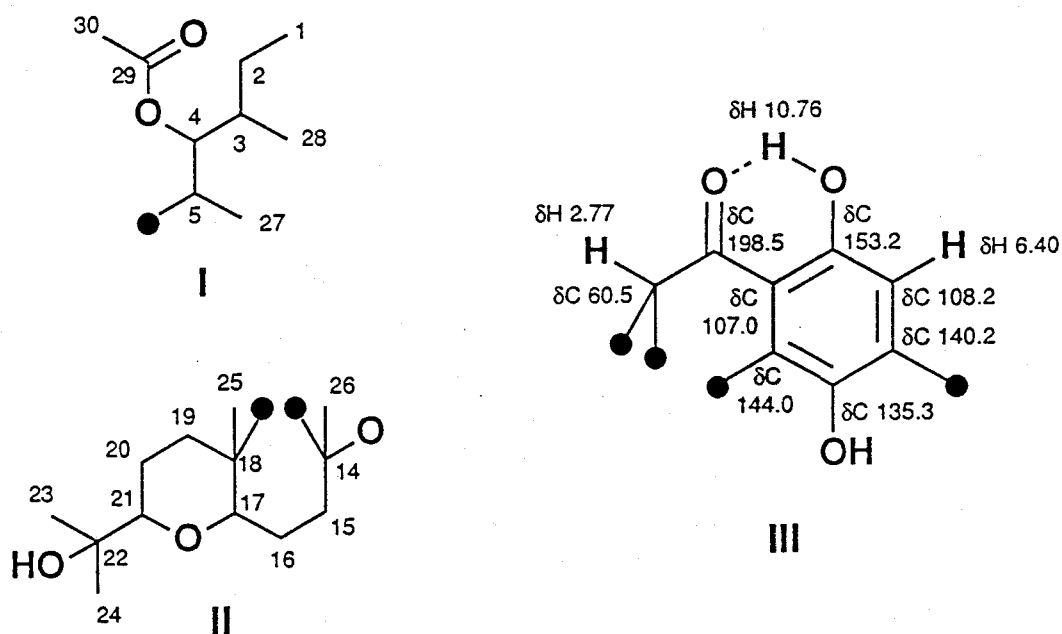


図2-12 毒素 3 のC-11 COSYスペクトル

毒素 4 については元素分析、MS (分子イオン $m/z$ 532) およびNMR分析の結果、1 と同じ $C_{30}H_{44}O_8$ の分子式をもつことが明らかになった。また $^{13}C$ -NMR スペクトルにおいて観測された30シグナルのうち22シグナルが、1 の1位から5位および14位から30位の炭素に相当するシグナルの化学シフト値によく一致し、このことから 4 が 1 の部分構造 I および II を共通にもつ類縁化合物であることが推定された。

1 と異なる8つの炭素シグナルのうち、1つはカルボニル炭素に、また6つはオレフィン (芳香族) 炭素に帰属できることが化学シフト値から推定された。残りの1つは3級の脂肪族炭素に由来するもので、C-H COSY解析からこの炭素には $^1H$ -NMR上  $\delta_H$  2.77ppmのシングレットシグナルを与えるプロトンが結合していることがわかった。このプロトンをLSPD (Long-range selective proton decoupling) 法<sup>23)</sup>を用いて低出力で照射したところ、先のカルボニル炭素とスピン結合定数6.1Hzで相互作用していることが判明し、 $>CH-CO-$ の部分構造の存在が推定された。さらにカルボニル酸素と水素結合していると考えられる  $\delta_H$  10.76ppmのプロトンを同様に選択的に低出力照射した結果、このプロトンと  $\delta_C$  107.0, 153.2および108.2ppmのシグナルを与える炭素との遠隔スピン結合が明らかとなり (それぞれ結合定数4.9, 3.7および6.8Hz), 以上のデータを満足する部分構造として III が導かれた。これら3つの部分構造を総合して、毒素 4 の全体構造を 1 の分子内酸化-還元異性体と推定し、これをX線結晶解析によって確認した (図2-16)。



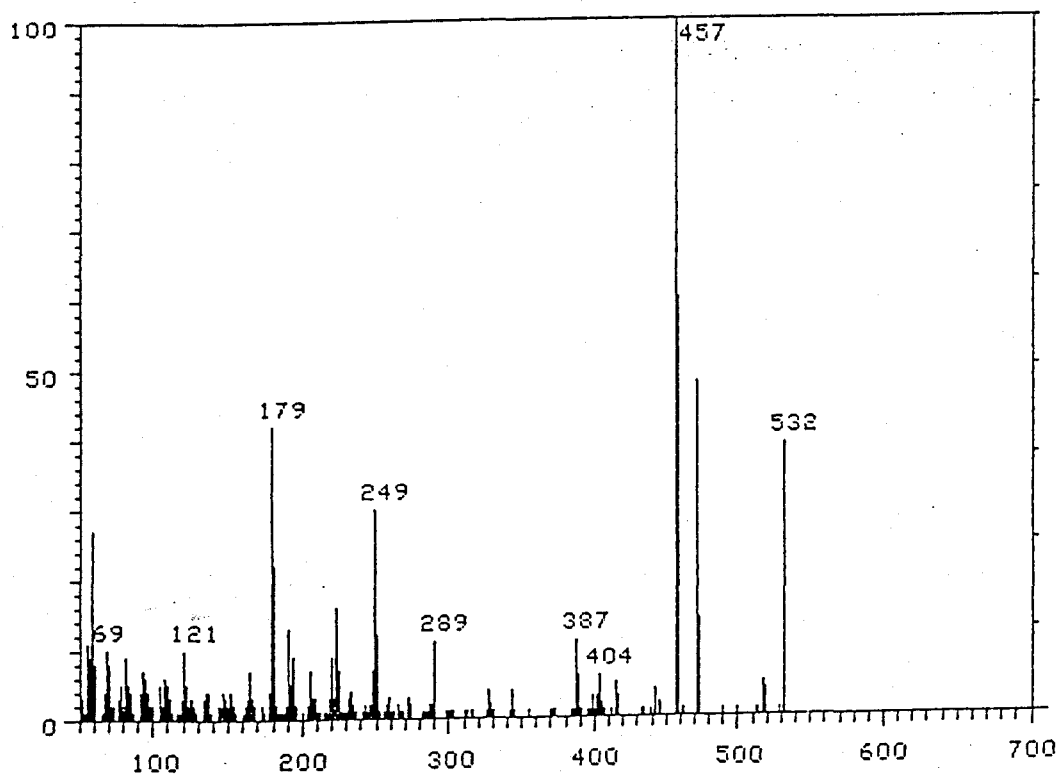
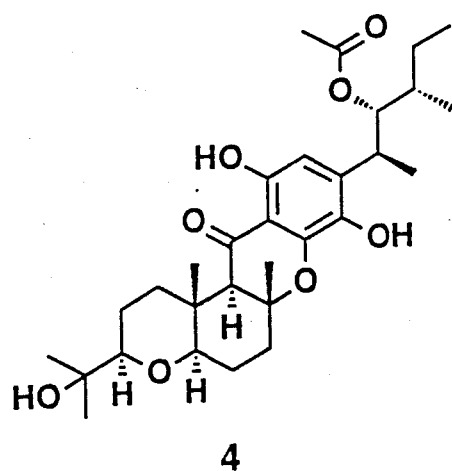
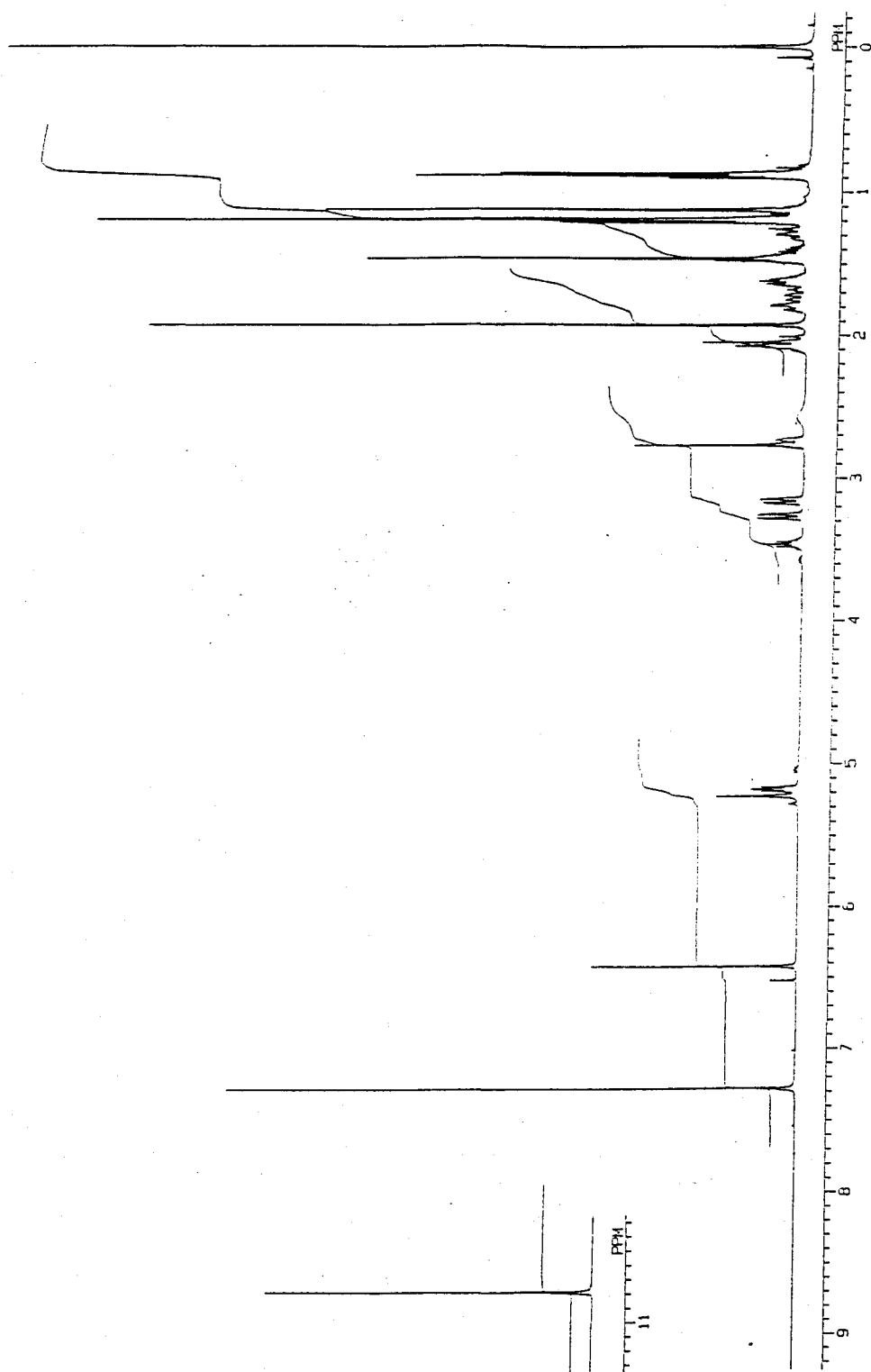


図2-13 毒素 4 のEI-MSスペクトル



図2-14 毒素 4 の<sup>1</sup>H-NMRスペクトル



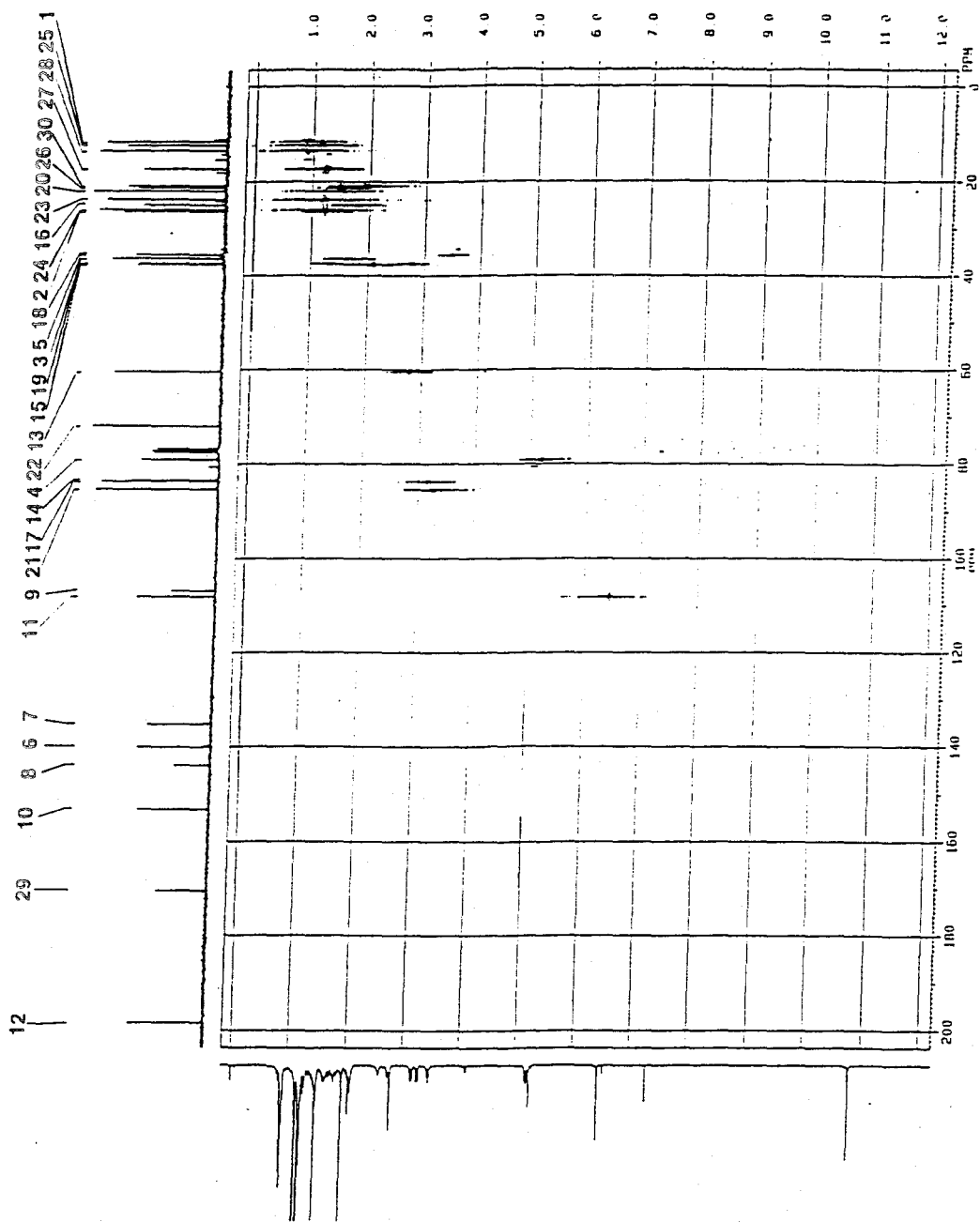


図2-15 毒素4のC-II COSYスペクトル

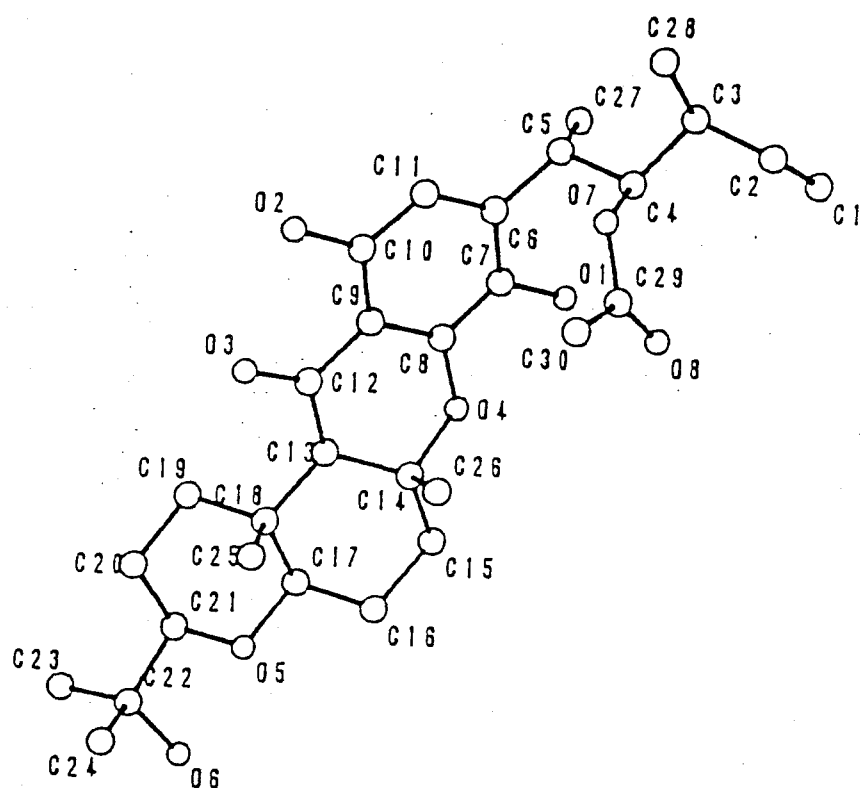


図2-16 X線解析により得られた毒素 4 の立体構造  
(簡略化のため水素原子は省略してある)

この結晶解析はまた、NMR解析で不明であった 4 の環系および部分構造 I における相対的な立体構造が 1 と同じであることを示し、このことから 4 では 1 の絶対構造が保持されているものと推察された。本化合物についてはこれまで文献記載がなく、isocochlioquinone Aと命名した。

毒素 1 - 4 の $^{13}\text{C}$ -および $^1\text{H}$ -NMRスペクトルの帰属結果を表2-1および2-2に示す。プロトンと炭素のシグナルの相関はC-H COSYスペクトル(図2-5, 9, 12および15)により確認した。化合物 1 および 2 における帰属は, Canonicaらの生合成実験の結果<sup>19)</sup>に拠ったが, 本研究のC-H およびH-H COSY測定(図2-5, 6および9)により 1 の4および12位ならびに 2 の5, 12および13位の炭素の帰属に誤りがあることがわかり, 表ではこれらを訂正して記載した。3 および 4 の帰属は 1 のデータを参考にして行った。また 4 の5から12位の炭素の帰属にあたっては上述のLSPD実験の結果とノンデカップリング・スペクトルを参考にした。

表2-1 毒素 1 - 4 の<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz) スペクトルデータ

Position <sup>a</sup>	$\delta_c$ (ppm) in CDCl <sub>3</sub>			
	1	2	3	4
1	11.4q <sup>b</sup>	11.7q	13.1q	11.5q
2	26.4t	25.8t	125.1d	26.5t
3	36.2d	47.4d	131.9s	36.2d
4	78.2d <sup>c</sup>	212.6s	81.3d	79.0d
5	34.6d	43.0d <sup>c</sup>	34.0d	35.5d
6	148.3s	145.5s	148.5s	140.2s
7	181.5s	181.5s	181.4s	135.3s
8	151.5s	152.2s	151.4s	144.0s
9	119.0s	118.6s	119.1s	107.0s
10	188.5s	186.6s	188.5s	153.2s
11	133.6d	133.5d	132.8d	108.2d
12	63.0d <sup>c</sup>	16.5t <sup>c, d</sup>	63.0d	198.5s
13	51.8d	46.6d <sup>c</sup>	51.7d	60.5d
14	83.0s	80.7s	83.0s	83.3s
15	37.5t	37.3t	37.5t	37.6t
16	25.2t	25.2t	25.2t	25.0t
17	83.8d	84.1d	83.8d	83.6d
18	36.7s	35.6s	36.7s	35.6s
19	38.5t	36.9t	38.5t	37.3t
20	21.5t	21.4t	21.5t	21.3t
21	85.1d	85.0d	85.1d	85.5d
22	71.7s	71.9s	71.8s	72.0s
23	24.0q	23.9q	23.9q	23.8q
24	25.9q	26.1q	25.9q	26.0q
25	12.6q	12.2q	12.5q	12.5q
26	21.0q	20.8q	21.0q	22.0q
27	17.2q	16.5q <sup>d</sup>	16.8q	17.5q
28	13.2q	14.9q	11.5q	13.5q
29	170.3s	-	169.7s	170.5s
30	20.7q	-	21.0q	20.8q

a 炭素の番号は文献19に従った。

b INEPT実験より求めたシグナル多重度を示す。

c 本研究により帰属を改めた

d 重複シグナル

表2-2 毒素 1 - 4 の<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz) スペクトルデータ

No. <sup>a</sup>	$\delta$ <sub>H</sub> ppm (J Hz)			
	1	2	3	4
1	0.88t <sup>b</sup> (7.0)	0.87t (7.2)	1.60d (6.0)	0.89t (7.0)
2	1.35+	1.39qnt (7.2)	5.55q (6.0)	1.25+
3	1.60+	2.70sxt (7.2)		1.63+
4	5.01dd (5.0, 7.5)	-	5.15d (8.8)	5.18dd (5.0, 7.5)
5	3.22+	4.10dq (7.0, 1.1)	3.31qnt (8.8)	3.46qnt (7.0)
7 (OH)				5.22
10 (OH)				10.76
11	6.54s	6.50d (1.1)	6.47s	6.40s
12	4.93dd (10.0, 1.3)	2.14dd (18.7, 12.4) 2.54dd (18.7, 4.6)	4.93dd (10.6, 1.2)	
12 (OH)	3.78d (1.3)		3.82d (1.2)	
13	1.72d (10.0)	1.46dd (12.4, 4.6)	1.72d (10.6)	2.77s
15	1.91dt (13.3, 3.8) 2.09dt (13.3, 3.3)	2.18m+ 2.10m	1.90m	2.06+
16	1.56+, 1.79+	1.80+	1.54+, 1.80m	1.60+, 1.80+
17	3.17dd (12.5, 3.8)	3.22dd (12.0, 3.6)	3.18dd (12.0, 4.0)	3.16dd (12.0, 3.8)
19	1.40+, 2.47m	1.20+, 1.90m	1.40+, 2.48m	1.30+, 2.75+
20	1.43+, 1.65+	1.50+, 1.63+	1.43+, 1.65+	1.60+

21	3.25dd (12.5, 2.5)	3.33dd (12.0, 2.9)	3.25dd (12.0, 2.8)	3.27dd (12.5, 2.5)
22 (OH)	2.55+	2.50+	2.58bs	2.58bs
23	1.17s	1.17s	1.17s	1.19s
24	1.18s	1.19s	1.18s	1.19s
25	1.01s	0.89s	1.02s	1.13s
26	1.32s	1.28s	1.32s	1.46s
27	1.14d (6.8)	1.15d (7.0)	1.04d (7.2)	1.20d (7.0)
28	0.87d (7.0)	1.29d (7.0)	1.62s	0.88d (6.8)
30	1.98s		1.95s	1.93s

a 番号は表2-1の炭素の番号に対応する。

b 記号はそれぞれ s, singlet; d, doublet; t, triplet; q, quartet; qnt, quintet; sxt, sextet; m, multipletを示す。+印を付したものはmultipletのシグナルが重なり合っていることを示す。これらの化学シフトはC-H COSYスペクトルから求めた。

## 2-3 植物毒性

本研究で得られた4化合物の植物毒性を表2-3に示す。活性の検定にあたってはBipolaris bicolorの宿主となるシコクビエおよびイネ幼苗の根の伸長阻害を指標として用いた。被験化合物のうちでは、収量の最も多かった1が最も高い活性を示した。検定に用いた2種の植物間の活性の差はいずれの化合物についても見られなかった。

表2-3 毒素によるシコクビエ(Eleusine coracana (L.) Gaertn.) およびイネ(Oryzae sativa L.) 幼苗の根の伸長阻害

根の伸長率 (% of control)				
毒素	シコクビエ (cv. Iyazairai 1)		イネ (cv. Chiyonishiki)	
	20ppm	100ppm	20ppm	100ppm
1	78.8	9.7	40.1	8.6
2	84.4	48.7	86.9	49.5
3	81.3	22.3	78.3	32.1
4	79.1	40.1	88.2	48.3

## 2-4 考察

イネ科植物に病原性をもつBipolaris bicolor El-1株から、植物毒素 1 - 4 を単離し、それらの構造をcochlioquinone Aおよびその類縁体と同定した。Cochlioquinone( 1 および 2 )は安定同位体を用いた生合成研究により、C-1からC-11のポリケチド部分とC12からC-26のセスキテルペン部分より構成されることが明らかになっている。<sup>19)</sup> 構造の類似性から考えて 3 および 4 も同じ経路により合成されるものと推察できるが、4 については1が非生



物的に異性化を起こして培地中あるいは単離途中で生成することも充分予想される。

得られた4つの化合物はいずれも生産菌の宿主植物であるシコクビエあるいはイネに対して生育阻害活性を示し、菌の感染過程や病徴の発現に何らかの役割を果たしているものと考えられた。これらの化合物はそのキノン部分構造から呼吸阻害作用をもつことが予想され、実際に1については、ウシ心筋ミトコンドリアのNADH-ユビキノン酸化還元酵素（複合体I）に対する、阻害作用が認められた。<sup>24)</sup> この複合体Iのキノン結合部位の立体構造は動物と植物との間で顕著な違いはないとされているので<sup>25, 26)</sup>、本研究で用いたシコクビエやイネにおいても1ならびにその類縁化合物である2-4が同様の阻害作用を示す可能性は高い。

化合物1-4の植物生育阻害活性がこのような呼吸阻害に起因するとすれば、その活性は非選択的で宿主であるイネ科植物以外に対しても毒性を示すことが考えられる。しかし、標的部位での作用が非選択的であっても、解毒代謝機構の違いが結果的に選択性をもたらす例は、スルフォニルウレア系化合物などの合成除草剤で、しばしばみられる。<sup>27)</sup> また特異的毒素ではないものの、選択性を示す植物毒素もいくつか知られている。例えば放線菌から得られたanisomycin<sup>28)</sup>はイヌビエやメヒシバ等には毒性を示すが、イネ等の栽培作物には毒性をほとんど示さない。*Alternaria alternata*が生産するtentoxinは、広い範囲の雑草にクロロシスを引き起こすが、トウモロコシや大豆には無害であるという。<sup>29)</sup> 本研究で得られた1-4の活性に関しては、まだ検討が不十分であるが、先に示したように用いた2種のイネ科植物については顕著な差は見られなかった。しかし発芽種子を用いた予備的な実験によれば、化合物1のダイコンやコマツナに対する生育阻害活性はイネやシコクビエに対してよりも弱いことが観察された。このような植物種間の活性の差が、生産菌の病原性の種間差と相関するかどうかは大変興味のもたれるところである。とくに本研究で用いたような多犯性の病原菌の宿主範囲を種、属さらには科のレベルで決定する化学物質というのはこれまでに例がない。今後さらに詳細な作用の検討が必要で、あわせて菌の孢子発芽時や宿主植物中での産生を精密かつ動的に解析することによりこれらの化合物の植物病理学的な意義がより明らかになると考えられる。

## 2-5 実験の部

**供試菌株**：実験に用いた *Bipolaris bicolor* El-1株は京都大学農学部農業研究施設津田盛也助教授より分譲していただいた。

**活性の検定**：発芽したシコクビエ (*Eleusine coracana* (L.) Gaertn. cv. Iyazairai 1) およびイネ (*Oryza sativa* L. cv. Chiyonisiki) 種子を、0.5mlの被験液を含んだ二層の濾紙上におき、暗黒下25℃に保持した。処理後24時間において根の長さを測定し、生長阻害を観察した。

**毒素の単離**：被験菌をジャガイモ-蔗糖寒天培地（直径9cm, 200枚）上で暗黒下24℃で14日間培養した。培養後、培地を菌体とともにアセトン（11ℓ）に24時間浸漬して抽出し、濾過後アセトンを減圧溜去してえられる水性溶液を酢酸エチルで抽出した。活性の認められた酢酸エチル層を濃縮してシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、カラムを*n*-ヘキサン-酢酸エチルの混合溶媒系で段階的に溶出した。毒素活性が認められた*n*-ヘキサン/酢酸エチル=3/2および2/3溶出画分について、さらにHPLC（カラム:Nucleosil 50-5, 7.5×300mm；移動相：*n*-ヘキサン/酢酸エチル（1:1），流速1ml/min）により精製した結果、毒素 2（保持時間27分, 92mg）および 3（保持時間19分, 84mg）が毒素 1 および 4 の混合物とともに得られた。混合物はさらに逆相系HPLC（カラム：TSK-gel ODS-120T, 20×300mm；移動相：アセトニトリル/水（7/3），流速6ml/min）で精製し、毒素 1（保持時間42分, 176mg）および 4（保持時間63分, 152mg）を得た。

**毒素の物理化学データ**：NMRデータは表2-1および2に示した。毒素 1：黄色針状結晶（*n*-ヘキサンより再結晶）mp 132-134℃. EI-MS  $m/z$ : 532( $M^+$ , 50%), 473(100), 395(49), 165(52), 57(76); UV  $\lambda_{\max}$ (EtOH) nm ( $\epsilon$ ): 270 (22000), 399(2400); IR  $\nu_{\max}$ (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3500, 1740, 1680, 1648, 1602;  $[\alpha]_D^{24} +140^\circ$  (c=0.1 in EtOH). 毒素 2：黄色針状結晶（*n*-ヘキサンより再結晶）mp 165-166℃. HR-MS  $m/z$ : Found: 472.2871( $M^+$ ); calcd. for  $C_{28}H_{40}O_6$ : 472.2825; EI-MS  $m/z$ : 472( $M^+$ , 9%), 388(93), 370(26), 243(20), 223(35), 205(22), 165(33), 85(52), 57(100); UV  $\lambda_{\max}$ (EtOH) nm ( $\epsilon$ ): 260(22000), 395(2100); IR  $\nu_{\max}$ (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3450, 1715, 1678, 1650, 1605;  $[\alpha]_D^{24} +100^\circ$  (c=0.1 in EtOH). 毒素 3：黄色油状固形物. EI-MS  $m/z$ : 530( $M^+$ , 34%), 471(20), 387(57), 371(100), 127(32), 85(39), 43

(28); UV  $\lambda_{\max}(\text{EtOH})$  nm ( $\epsilon$ ): 268(20000), 387(2700); IR  $\nu_{\max}(\text{KBr})$   $\text{cm}^{-1}$ : 3480, 1740, 1680, 1650, 1602;  $[\alpha]_D^{24} +80^\circ$  ( $c=0.1$  in EtOH).

毒素 4 : 黄色柱状結晶 (*n*-ヘキサンより再結晶) mp 166 - 168°C. Anal. Found: C, 66.21; H, 8.41%. Calcd. for  $\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{O}_8 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ : C, 66.52; H, 8.37%; EI-MS  $m/z$ : 532( $M^+$ , 38%), 472(48), 457(100), 249(30), 179(42); UV  $\lambda_{\max}(\text{EtOH})$  nm ( $\epsilon$ ): 243(12000), 283(24000), 383(6500); IR  $\nu_{\max}(\text{KBr})\text{cm}^{-1}$ : 3430, 1730, 1642, 1580;  $[\alpha]_D^{24} +65^\circ$  ( $c = 0.1$  in EtOH).

毒素 4 の X 線結晶解析: 得られた単結晶の結晶学的データは以下のとおりであった。晶系; 斜方晶, 空間群;  $P2_12_12$ , 単位格子;  $a=24.135(2)$ ,  $b=18.618(2)$ ,  $c=6.432(1)\text{\AA}$ 。Ni透過Cu-K $\alpha$ 線を照射し, 回折強度を $2\theta = 120^\circ$ まで測定した。構造はSHELXS86<sup>30)</sup>を用いた直接法により解析し, 逐次フーリエ法により全原子を決定した。<sup>31)</sup> 構造の最適化は関数 $\sum w(|F_o-F_c|)^2$ を $w = 1.0$ として最小となるようFMLSプログラム<sup>32)</sup>を用いた完全行列法により行った。水素原子の位置は差フーリエ合成図から決定した。最適化により最終的に得られたR値は $F_o \geq 3\sigma(F_o)$ を満たす1977の回折データについて0.063であった。

### 第3章 オオムギにおけるうどんこ病抵抗性関連物質

#### 3-1 緒言

オオムギではこれまでにうどんこ病菌に対する抵抗反応について多くの研究がなされており、また抵抗性に関与する遺伝子についても詳細に解析がおこなわれてきた。<sup>33-35)</sup> うどんこ病菌の胞子はオオムギ表皮上で接種後約4時間に発芽し、約8時間後に付着器を形成する。さらに12~15時間後に侵入糸を出し、オオムギの表皮を貫穿し始める。ここで菌と宿主オオムギの間の関係が親和性の場合、この後さらに吸器の形成、二次菌糸の伸長へと続いて感染が確立される。これに対し両者の関係が不親和性の場合には、侵入を試みたうどんこ病菌の菌糸の貫穿は感染に対応して宿主に形成されるパピラ（細胞壁が肥厚した部分）の部分で阻止されてしまうか、あるいはたとえ貫穿が成功しても細胞内で吸器を形成するに至らない。このとき感染の阻止に成功したオオムギ葉の表皮組織を顕微鏡で観察すると、菌との相互作用部位の近傍には黄色の蛍光性物質の顕著な蓄積が認められ、その蓄積の程度は遺伝子によって支配されるうどんこ病抵抗性の強度とよく相関することが明らかにされている。<sup>36-38)</sup> この現象は、オオムギのうどんこ病抵抗性の発現に何らかの化学的因子が関与していることを示しており、また実際に部分精製したこの黄色蛍光性物質は*in vitro*でうどんこ病菌の胞子の発芽を阻害することから、直接の防御物質として機能している可能性も推察されている。<sup>39)</sup> しかしその後の多大な努力にもかかわらずこの蛍光性物質の単離は成功せず、抵抗性のメカニズムの解明に大きな示唆を与えると思われるその化学的な性状は現在のところ明らかになっていない。

一方、この黄色蛍光性物質はオオムギに物理的障害を与えたり、UV照射を行うなどのストレスを与えたときにも蓄積することが観察されている。一般にこのようなストレス処理が病害抵抗反応と同様の反応を誘導することはしばしば観察されており、イネ科植物についても、例えばオリザレキシンやサクラネチンなどのファイトアレキシンがUV照射によって誘導されることが報告されている。<sup>40, 41)</sup> 従って、ストレス反応の解析は、先に述べたうどんこ病菌との相互作用に伴うオオムギの代謝変動を解明する上での、何らかの手掛かりを与えることが期待される。

本章ではこのような観点から、オオムギのストレス物質について検討を加えた結果を述べる。ストレス処理としては葉身に対する物理的障害とUV照射の2種を用い、処理を施した後に生成するストレス物質のうち抗菌性および蛍光性をもつものを検出して、その構造を解析した。またあわせて同定されたストレス物質について、実際にうどんこ病菌を接種したオオムギ葉身中の生成量を分析し、抵抗性との関連を考察した。

### 3-2 抗菌性ストレス物質の検索と同定

まず、ストレス処理として組織に障害を与え、これにより誘導生成する化合物のうち感染に対する防御の観点から抗菌活性を有するものを検索した。すなわち、播種後約2週間のオオムギ幼苗（品種ミノリムギ）の葉身組織（500g）を破碎し、一定時間放置後80%メタノールで抽出して生成している抗菌性物質をウリ類炭そ病菌（*Colletotrichum lagenarium*）を被菌験菌とするTLC-バイオオートグラフィーで検出した。この結果、*n*-ヘキサン/酢酸エチル/メタノール/水（25:25:1:50）を移動相とするシリカゲルTLC上で $R_f$  0.3付近に抗菌性スポットの生成が認められた。

この抗菌性物質を明らかにするために、酢酸エチル-水系による分配、SEP-PAK C18カラムによるクロマトグラフィーおよび逆相HPLCによる精製を行い、純化された油状物質（12mg）について各種機器分析による構造解析を行った。得られた物理化学的データを以下に記載する。

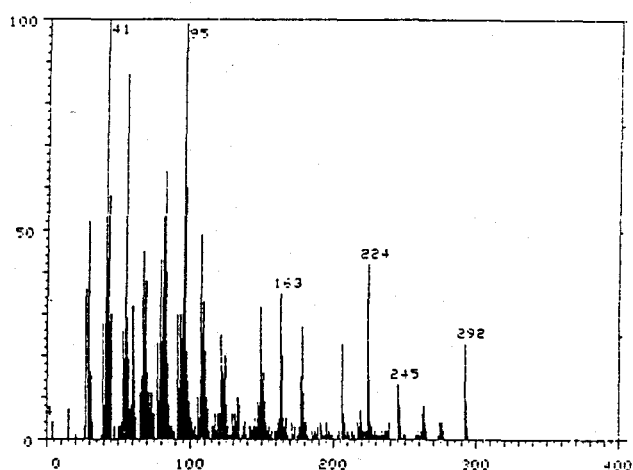


図3-1 抗菌性物質 5 のEI-MSスペクトル

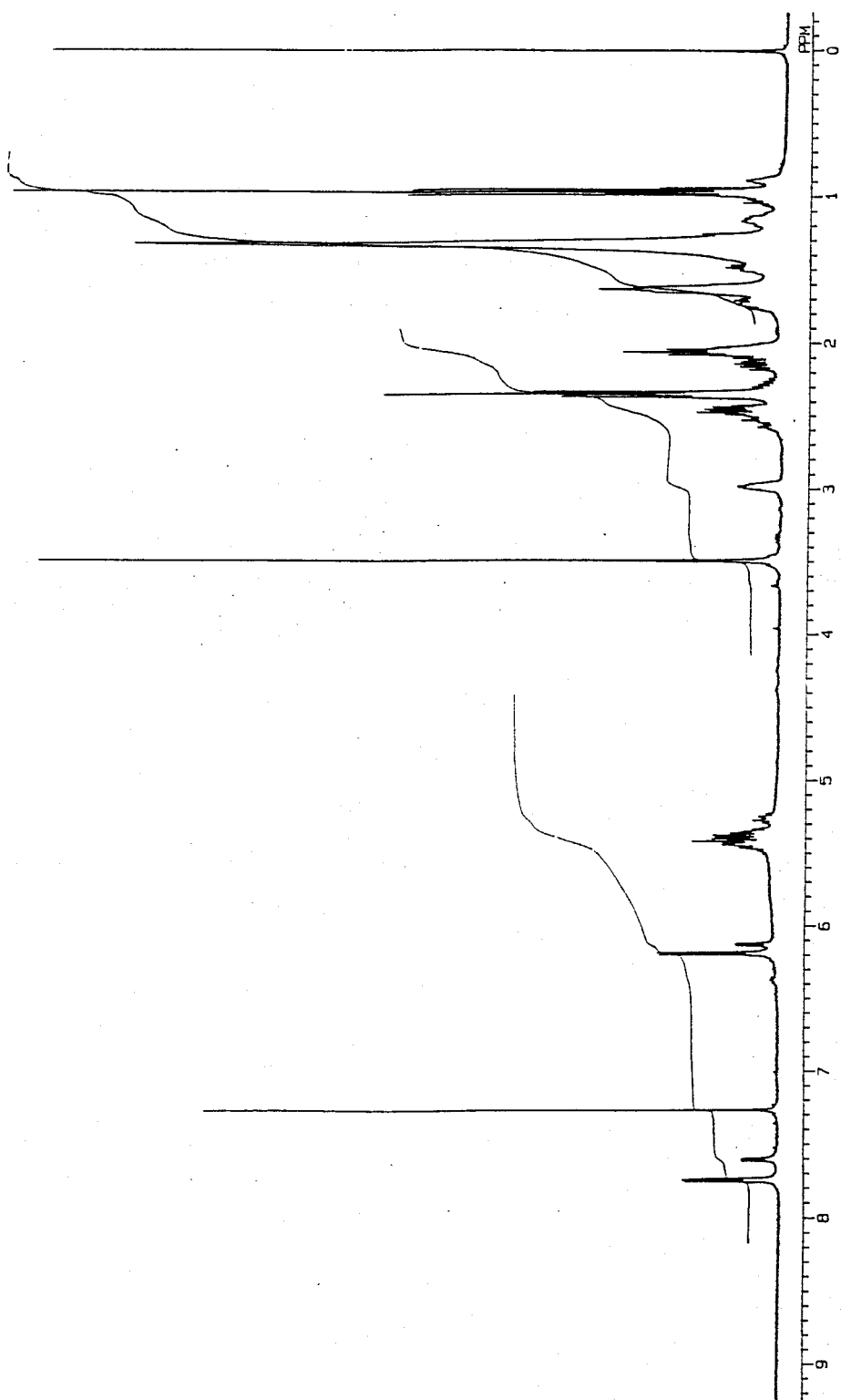
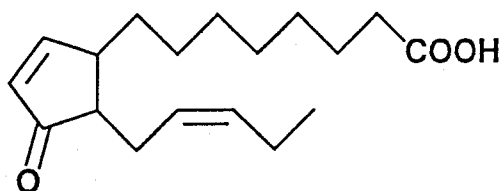


図3-2 抗菌性物質 5 の $^1\text{H}$ -NMRスペクトル

UV  $\lambda_{\max}(\text{MeOH})$  nm: 219; EI-MS  $m/z$ : 292 ( $M^+$ ), 245, 163, 95, 41.  $^1\text{H-NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm: 7.74 (1H, dd,  $J=5.9, 2.9$ ), 7.61 (0.33H, dd,  $J=5.7, 2.4$ ), 6.19 (1H, dd,  $J=5.9, 1.5$ ), 6.13 (0.33H, dd,  $J=5.7, 2.0$ ), 5.40 (2.33H, m), 5.27 (0.33H, m), 2.98 (1H, m), 2.40-2.58 (2.66H, m), 2.35 (2.66H, t,  $J=7.5$ ), 2.28 (0.33H, m), 2.15 (1H, m), 2.06 (2.66H, t,  $J=7.3$ ), 2.02 (0.33H, m), 1.73 (1H, m), 1.63 (2.66H, m), 1.48 (0.66H, m), 1.32 (プロトン数不明, m), 1.16 (1H, m), 0.97 (3H, t,  $J=7.3$ ), 0.96 (0.99H, t,  $J=7.3$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (22.5MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm: 210.8 (s), 179.2(s), 167.0(d), 133.0(d), 132.5(d), 127.0(d), 49.9(d), 44.3 (d), 33.9(t), 30.7(t), 29.5(t), 28.9(t), 28.8(t), 27.6(t), 24.6(t), 23.9(t), 20.8(t), 14.0(q). シグナルの多重度はINEPTにより決定した。

得られた抗菌性物質は $^1\text{H-NMR}$ スペクトルより、組成比3:1の異性体の混合物であると考えられた (なお,  $^{13}\text{C-NMR}$ データは主要成分のもののみ記載した)。分子式は以上のデータを総合して $\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{O}_3$ と推定され、これから求められる不飽和度 (5) と観測された $\text{sp}^2$ 炭素の数から分子内に環構造が1つ含まれるものと予想した。

この環構造について、 $\delta_c$  210.8のカルボニル炭素のシグナルと $\delta_c$  167.0の極めて特徴的なメチン炭素シグナルは2-cyclopentenone構造の存在を示唆した。そこで分子式とこの部分構造をもとに検索を行った結果、本物質のプロトンNMRスペクトルに見られる各異性体のシグナルは12-oxo-10,15-phytodienoic acid (5) のcis体およびtrans体それぞれの文献値<sup>42)</sup>とよく一致していることが判明した。また $^{13}\text{C-NMR}$ およびH-H COSY (図3-3) のデータもこの構造を支持し、以上より本物質の構造を5と決定した。ここで、異性体混合物の主要成分はcis体であった。なお、本化合物においてはcisからtrans体への異性化が極めて容易に進行することが知られており、ここで副成分として認められたtrans体は単離過程に生じたartifactであると考えられた。



5

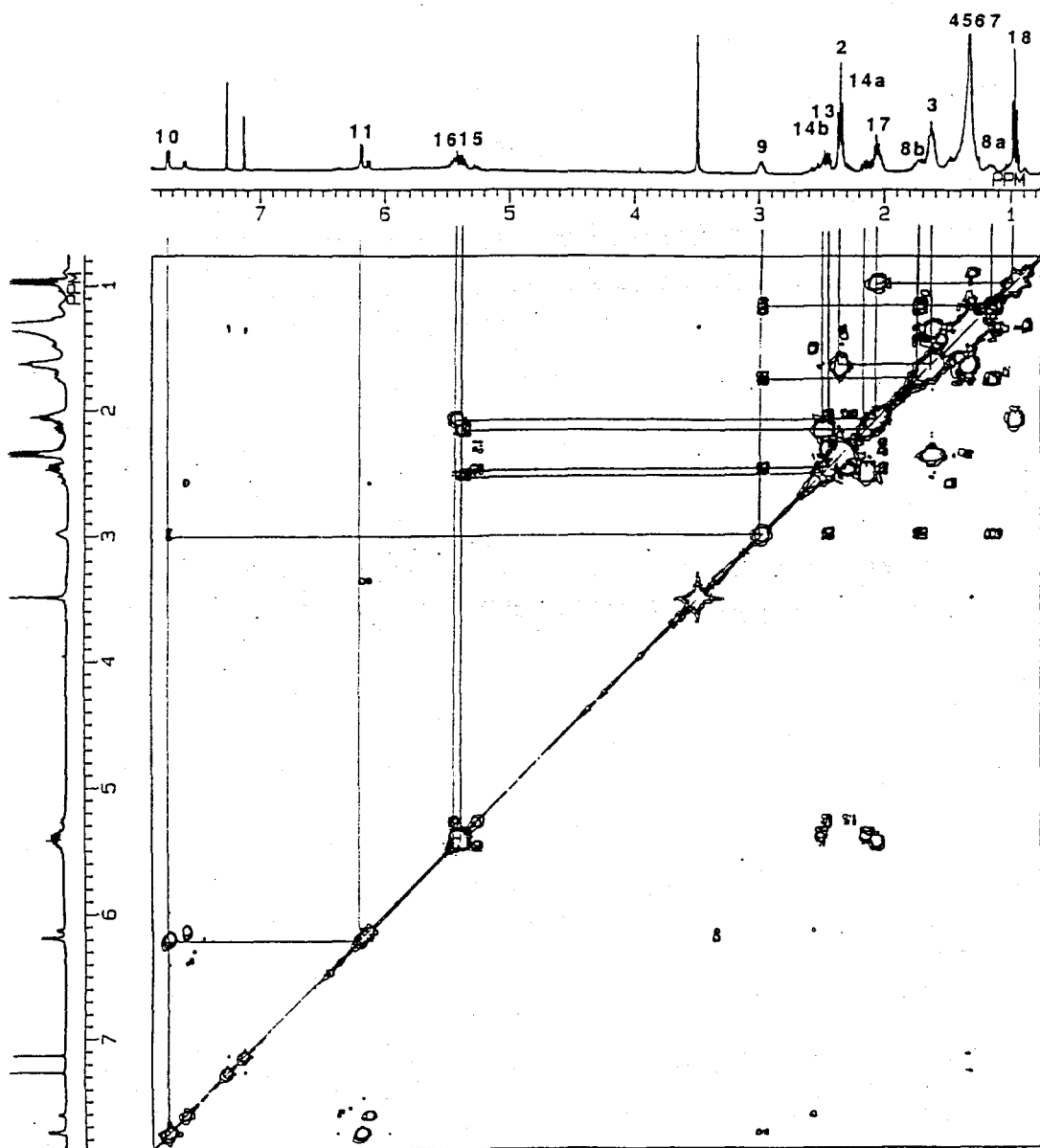


図3-3 抗菌性物質 5 のH-H COSYスペクトル



### 3-3 蛍光性ストレス物質の探索と同定

次に、うどんこ病菌との不親和な相互作用により蓄積する物質が蛍光性を有することを考慮して、オオムギにおける蛍光性ストレス化合物を探索した。このためのストレス処理としてはUV照射を行った。

播種後2週間のオオムギ幼苗（品種ミノリムギ）をUV殺菌灯を用いて10分間照射し、25℃にて24時間保持後、葉身をメタノールで抽出した。この抽出物に含まれる蛍光性の代謝物組成の変化を蛍光検出器（検出光410nm、励起光290nm）を装備したグラジエント逆相系HPLC（カラム、COSMOSIL 5C18-AR, 4.5×150mm; 移動相、0.1%  $\text{H}_3\text{PO}_3$ を含む20%メタノールを5分間流した後メタノール含量を25分間で80%まで増加。流速毎分0.8mℓ）で分析したところ、照射葉に図3-4に示すように保持時間5.7分のピークを与える蛍光性物質が顕著に生成することが認められた。

この物質の構造を明らかにするために、UV照射葉（420g）を80%メタノールで抽出し、抽出液を減圧濃縮後、酢酸エチルー水で分配した。得られた水相について、さらに2段階の逆相系HPLCで精製し、目的の蛍光性物質（10mg）を得た。本物質の物理化学データは次のようであった。

UV  $\lambda_{\text{max}}$ (MeOH) nm: 278, 218; EI-MS  $m/z$ : 160( $\text{M}^+$ ), 131, 130, 103, 69, 45;  $^1\text{H-NMR}$  (90MHz, MeOH- $\text{d}_4$ )  $\delta$ : 7.52-7.68 (4H, m), 7.35-7.48 (1H, m), 7.03-7.24 (3H, m), 3.10-3.30 (4H, m);  $^{13}\text{C-NMR}$  (22.5MHz, MeOH- $\text{d}_4$ )  $\delta$ : 138.4(s), 128.1(s), 124.2(d), 122.8(d), 120.1(d), 118.8(d), 112.5(d), 110.2(d), 41.2(t), 24.5(t) (以上の多重度はINEPTにより決定した)。

本化合物はニンヒドリン反応で陽性を示し、この反応性と上記のスペクトルデータを総合して、その分子式を $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2$ と推定した。推定された分子式をもとに検索を行い、データを標品と比較した結果、UV照射によりオオムギに顕著に蓄積する本蛍光性物質をtryptamin (6) と同定した。

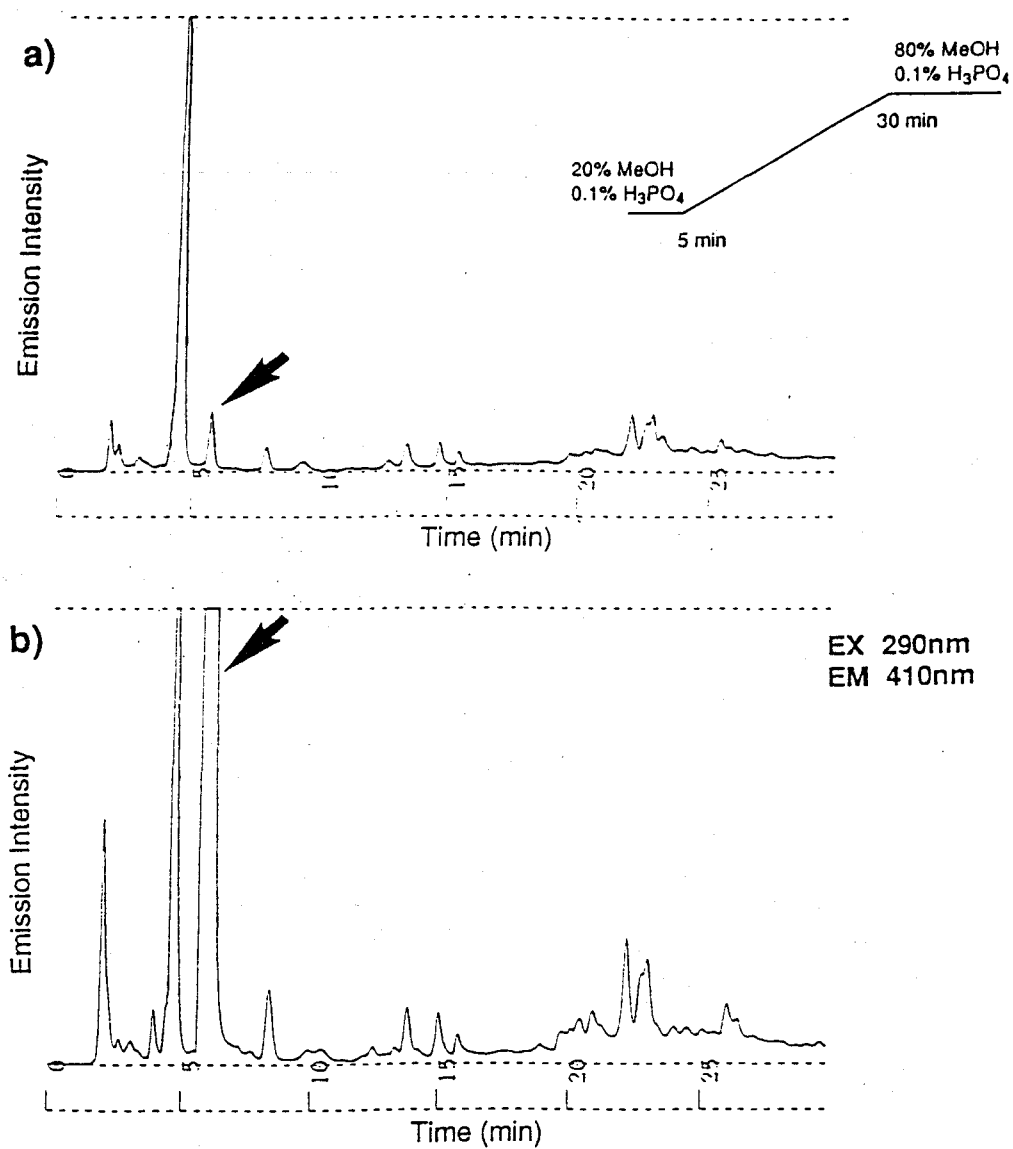


図3-4 UV照射により生成する蛍光性物質のHPLC分析.  
a) 非照射葉, b) 照射葉

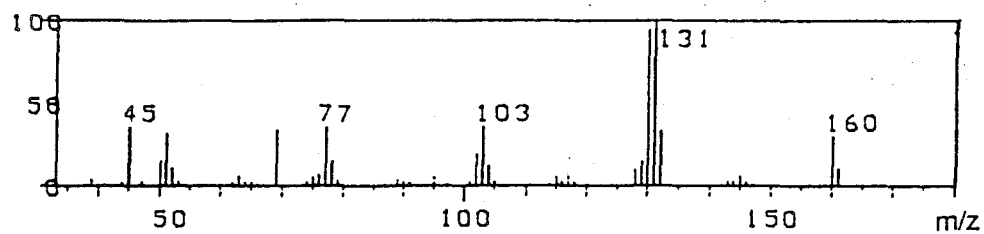
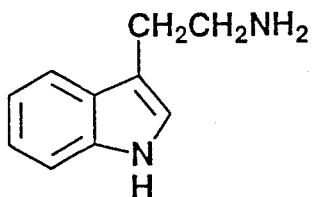


図3-5 蛍光性物質 6 のEI-MSスペクトル



6

### 3-4 ストレス物質の生成量の分析

前節で同定した二つのオオムギのストレス物質について、種々のストレス処理を与えた後の生成量を定量的に分析した。

まず、5の組織破碎処理による生成量の変化ををHPLCで分析した結果、その含量は未処理葉では $2\mu\text{g/g}$  tissue以下しか検出されなかったのに対し、処理後には $20\mu\text{g/g}$  tissueと約10倍の増加がみられた。しかし後に述べるようなUV照射や病原菌接種などの他のストレス処理によっては顕著な増加はみられず、この誘導は傷害に特異的なものと考えられた。

次に、6についてUV照射後の葉身中の生成量を、蛍光検出器を装備したHPLCを用いて定量した。その結果、表3-1に示すように6の含量は、照射後24時間で約70倍に増加することが解った。また6は、オオムギ葉枯病菌 *Bipolaris sorokiniana*の接種による生物的なストレスによっても誘導されることが観察され、接種葉における含量は非接種葉に比べ約10倍高かった。

表3-1 ストレス処理後のオオムギ（品種ミノリムギ）葉身における  
tryptamine含量

処理	処理後日数	含量 ( $\mu\text{g/g}$ 新鮮重)
対照		2.1
UV照射	1	140.0
葉枯病菌接種	3	19.7

6については、さらにオオムギのうどんこ病抵抗性との関連も検討した。すなわち、オオムギうどんこ病菌 (*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* race I) の胞子をオオムギの感受性品種(ゴセシコク)および抵抗性品種 (Turkey 290) にそれぞれ接種し、葉身内に生成する6の量を接種後8日に定量した。結果を図3-6に示す。接種後の6の含量は感受性、抵抗性いずれの品種においても増加がみられた。しかし、葉身上に過敏反応による多数の斑点が形成され菌の伸展が阻害されている抵抗性品種における含量は、活発な孢子形

成がみられる感受性品種における含量に比べ、約4倍高かった。

なお、5 については、感受性、抵抗性いずれの品種においてもうどんこ病菌接種による誘導は検出されなかった。

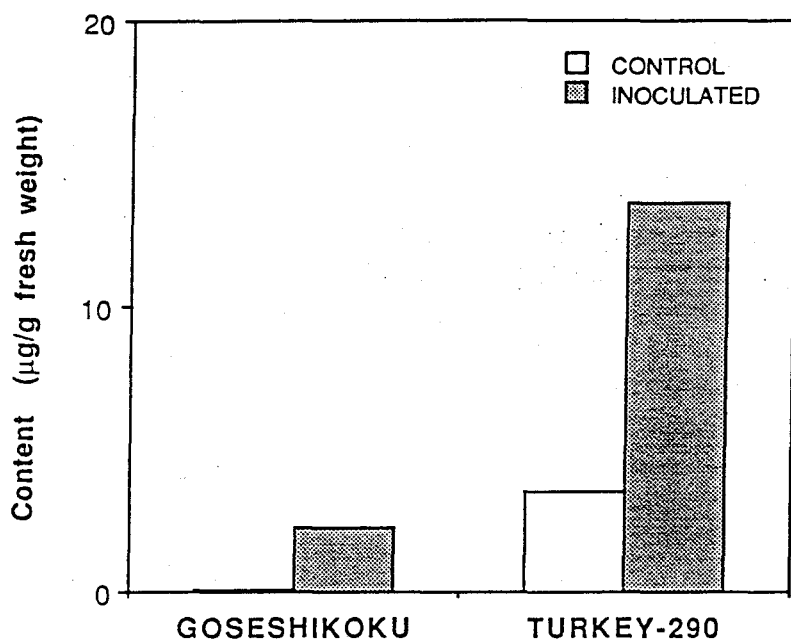


図3-6 うどんこ病菌接種後8日におけるオオムギ葉身中のtryptamine含量  
品種: ゴセシコク (感受性), Turkey 290 (抵抗性)

### 3-5 ストレス物質のうどんこ病菌に対する抗菌性

本章で同定したオオムギのストレス物質12-oxo-10,15-phytodienoic acid (5)およびtryptamine(6)のうどんこ病に対する防御物質としての役割を評価するため、*in vitro*における抗菌性試験を行った。

図3-7に示すように、いずれの化合物についてもうどんこ病菌の孢子発芽阻害活性が認められ、ED<sub>50</sub>値は5で13ppm、6で25ppmと求められた。

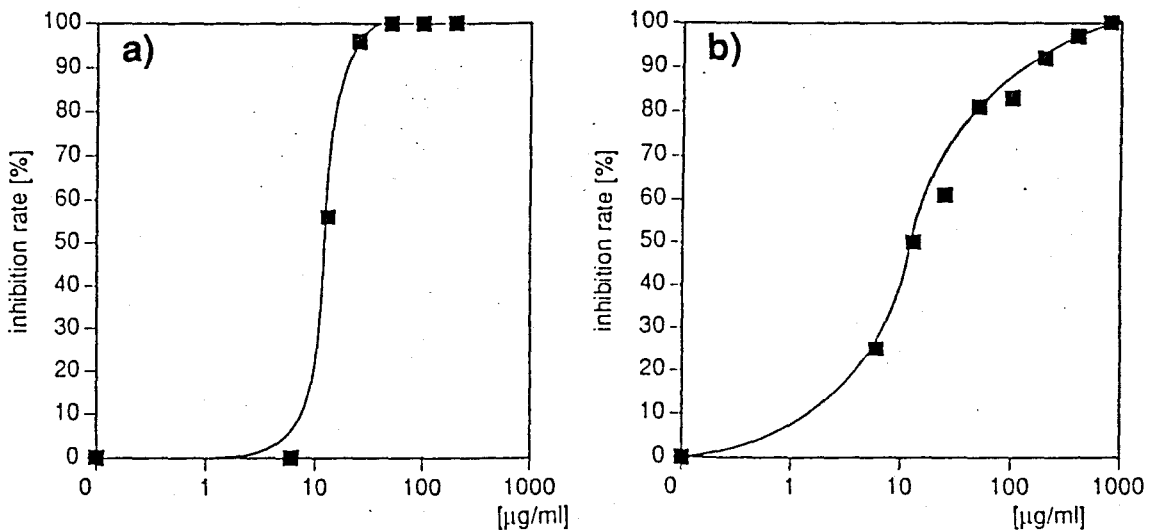


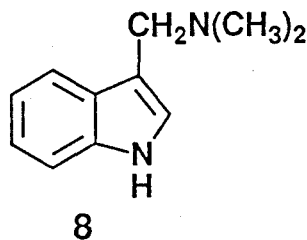
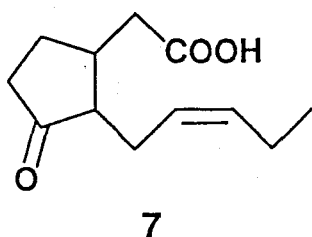
図3-7 12-Oxo-10,15-phytodienoic acid (a) およびtryptamine (b) によるうどんこ病菌孢子発芽阻害

### 3-6 考察

オオムギの病害抵抗性に関与する化学因子を解明する手掛かりを得るため、そのストレス物質を検討した結果、12-oxo-10,15-phytodienoic acid(5)とtryptamine(6)を同定した。

5はオオムギ組織に傷害を与えた場合にその誘導が認められた。5は、リノレン酸からリポキシゲナーゼによる13位への酸素添加、エポキシド形成および環化を経て生合成され<sup>43,44)</sup>、同様の、傷害による5の誘導蓄積はトウモロコシでも観察されている。<sup>45)</sup> また、この生合成に関わる酵素の活性は種々の植物で検出されており、5の生成は植物の傷害ストレス反応として一般的なものであると考えられる。植物体内で5はさらに代謝されてジャスモン酸(7)へと変換される。<sup>44)</sup> 7は、近年その植物における生理活性が注目されており、とくに傷害や病原菌の感染に対する反応にシグナル物質として関わっているのではないかと考えられている。<sup>46)</sup> 実際に、イネ科植物でもイネでファイトアレキシンがジャスモン酸やその前駆物質である酸化不飽和脂肪酸により誘導されることが示されており<sup>47,48)</sup>、抵抗性発現過程におけるメッセンジャー物質としての機能とともに、病原菌の感染がどのように認識されジャスモン酸合成系の活性化をもたらすのかという問題について精力的な研究がなされている。

オオムギにおける5あるいは7のうどんこ病抵抗性発現におけるシグナル物質としての意義は現在のところ不明であり、その役割には興味をもたれる。また抗菌性試験の結果は、5の直接の防御物質としての役割も期待できることを示した。しかし、本研究において5の誘導がみられたのは、試みた処理のうち傷害処理を行った場合のみで、うどんこ病菌接種時には顕著な誘導を認めることはできなかった。同様の事例はエンバクでも観察されて



おり、傷害により誘導される抗菌性物質26-desglucoavenacosideは、うどんこ病菌と同じく絶対寄生菌である冠さび病菌の接種によっては誘導されず、このことからこの抗菌性物質は宿主の同病抵抗性においては重要な因子ではないと結論づけられた。<sup>49)</sup> 今回の結果をみるかぎり、5 についてもうどんこ病の抵抗性発現とはあまり関連がないように思われるが、うどんこ病菌のような絶対寄生菌がオオムギに感染する際に与える傷害の程度はかなり小さいので、今回のように葉身全体で分析した場合、用いたHPLCによる検出法では極微量生成している5を正確には把握できていないおそれが十分ある。従って、微量であっても菌との相互作用部位に5が局所的に効率よく生成することにより菌の生育が阻害される可能性は否定できない。また、とくに5や7のシグナル物質として機能を想定した場合、実際の組織内では植物ホルモンのように極めて微量で活性を発現することが予想される。以上より、うどんこ病菌との相互作用におけるオオムギの5およびその関連物質の意義を論ずるには、より精密な分析法を用いた検討が必要であろう。

一方、UV照射により顕著な蓄積が認められた6については、葉枯病菌接種による生物的なストレスによっても誘導がみられた。さらにはうどんこ病菌を接種した場合に抵抗性品種と感受性品種との間で生成量に差が認められ、抵抗性品種における含量は感受性品種に比べ約4倍高かった。なお、ここでみられた差は葉身全部を抽出して分析した含量を単純に比較したものである。抵抗性品種における病原菌との相互作用は感受性品種の場合と比較して制限されており、その影響をうける植物体部分の大きさがはるかに小さいことを考慮すれば、各品種の相互作用部位における局所的な6合成活性の差は見かけ上の差よりもかなり大きいのではないかと推察される。いずれにせよ、6はこのようにうどんこ病抵抗性の強度に相関して誘導され、かつ抗菌性試験でも阻害活性を示したことから、オオムギにおいて防御物質（ファイトアレキシン）として機能している可能性が示唆された。オオムギではこれまでに幼苗に含まれる抗菌性物質hordatine類<sup>50, 51)</sup>やbenzoquinone<sup>52)</sup>がファイトアレキシンの候補化合物として提唱されてきたが、病理学的に意義が認められた化合物はなく、この点で本研究で得られた結果は極めて興味深いものである。今後さらにオオムギ各品種の遺伝的に決定されるうどんこ病抵抗性と6の合成蓄積能との関係を詳細に調べることにより、防御物質としての役割を検証すべきであると考えらる。



オオムギにおけるインドール化合物としては、グラミン（８）がよく知られている。<sup>53, 54)</sup> グラミンにはこれまで植物毒性<sup>55, 56)</sup>や、摂食阻害活性<sup>57)</sup>などの生理活性が観察されており、従って病害抵抗性に関してもなんらかの寄与があるのではないかと予想される。しかし、本研究において用いたオオムギ試料にも多くの８がHPLCで検出されたものの、その含量はうどんこ病罹病性品種と抵抗性品種との間で実質的な差は見られず、またいずれの品種でも接種による顕著な誘導は見られなかった。このことから８は少なくともオオムギのうどんこ病抵抗性には重要な役割を果たしていないものと考えられる。

3-1で述べたように、これまでの研究によってオオムギのうどんこ病抵抗性の発現は、相互作用初期における感染部位での黄色蛍光性物質の蓄積と相関することが明らかにされている。<sup>36-38)</sup> この黄色物質は、組織生化学的な手法に基づいた観察によれば<sup>37)</sup>、他の植物でしばしば抵抗反応に付随して生成するリグニンとは異なるようであるが、未だ化学的な性状については明らかでない。今回ストレス物質として同定した６が蛍光性を示すことは、このオオムギうどんこ病菌の系における抵抗反応への関与を示唆するようで興味深い。その蛍光スペクトル（極大360および690nm）が、顕微鏡下で観察されているオオムギ組織中の黄色物質のスペクトル（極大540nm）とは異なっており、６はこの現象の直接の原因物質ではないと考えられる。ただし、６の誘導体5-hydroxytryptamineの蛍光スペクトルの極大値（540nm）<sup>54)</sup>が黄色蛍光物質のそれと一致することは注目に値する。すなわち、このような６の誘導体が細胞壁にとりこまれ、難溶性の化合物を構成しているのかもしれない。

本章の結論として、オオムギで明らかにした2種のストレス化合物のうち、６がファイトアレキシン様の機能を有することが見いだされた。本物質と、これまでオオムギのうどんこ病抵抗反応として観察されてきた細胞反応との関連は未だ不明な点があるが、抵抗反応に伴う代謝変動を解明する上で示唆に富む結果が得られたものと信ずる。６は植物におけるシキミ酸由来の二次代謝物であり、コリスミン酸、アントラニル酸およびトリプトファンを経て生合成される。イネ科ではアントラニル酸由来の防御物質として、4-hydroxy-1,4-benzoxazin-3-one類が数種の植物で<sup>58)</sup>、また次章で扱うavenalumin (avenanthramide) 類がエンバクで知られている。アントラニル酸代

謝の制御はイネ科植物のストレス反応あるいは病害抵抗反応における一つの重要な鍵であるかもしれない。

### 3-7 実験の部

生物試料：オオムギの品種ミノリムギは一燈園農事研究所（京都）より購入した。また品種ゴセシコクおよびTurkey-290は近畿大学農学部獅山慈孝教授より供していただいた。ストレス処理に用いたオオムギ葉枯病菌Bipolaris sorokiniana 57-10株は京都大学農学部農薬研究施設の津田盛也助教授より分譲していただいた。またオオムギうどんこ病菌Erysiphe graminis f. sp. hordei レースIは近畿大学獅山教授より分譲していただいた。

TLC-バイオオートグラフィー：試料溶液の一定量をシリカゲル薄層プレートに塗布し、所定の溶媒系でクロマトグラフィー展開した。風乾により溶媒を除去したプレート上にPSA培地（Difco製）に懸濁したウリ類炭そ病菌（Colletotrichum lagenarium）の孢子を噴霧し、温室において24℃で3日間保持した。抗菌性物質は孢子発芽と菌糸伸長により暗緑色になったプレート上で、発芽が抑制されて白いスポットとして検出された。

組織破碎処理により誘導される抗菌性物質の単離：播種後2週間のオオムギ幼苗（品種ミノリムギ）の葉身（500g）を、長さ約1cmの切片とし、さらに乳鉢中で組織破碎をおこなった。4時間後、5倍量の80%メタノールを加えて抽出し、残渣を濾過後抽出液を減圧濃縮した。抽出物中に抗菌性物質が含まれることをTLC-バイオオートグラフィーで確認後、活性物質を酢酸エチルに転溶させ、さらに80%メタノール/*n*-ヘキサン系で分配を行って低極性物質を除去した。得られた80%メタノール層を濃縮し、再度50%メタノール懸濁液としてSEP-PAK C18カラム（5g）に吸着させ、溶出液のメタノール含量を増加させながら順次溶出させた結果、目的物は70%メタノール画分に得られた。この画分について、さらに逆相系HPLC（カラム、COSMOSIL 5C18AR, 20×250 mm；移動相、80%メタノール+1%酢酸, 4ml/min；検出、UV254nm）により抗菌性を示す部分を分取して精製を行い、減圧濃縮後、油状物（11.8mg）を得た。

UV照射により誘導される蛍光性物質の単離：播種後2週間のオオムギ（品種ミノリムギ）幼苗に約20cmの距離から殺菌灯ランプ（東芝GL-15）で10分

間照射した。24時間後、地上部(470g)を刈り取り5倍量の80%メタノールを加えてホモジナイズした。得られた抽出物はガーゼ濾過した後、減圧濃縮した。この濃縮物に目的の蛍光性物質が含まれることをHPLCで確認後、酢酸エチル-水系で分配を行い水層を得、ついでこの水層をSEP-PAK C18カラムにアプライした。カラムを水で洗浄後、20%メタノールで溶出し、減圧濃縮した溶出液について逆相系HPLCによる精製を行った。ここでカラムはCOSMOSIL 5C18-AR, 20×250mmを用い、移動相として0.1%トリフルオロ酢酸を含む20%メタノールを用いた。これにより得られた粗画分はさらに同じカラムを用い、移動相を0.1%トリフルオロ酢酸を含む15%アセトニトリルとしたHPLCで精製し、目的の蛍光性物質(10mg)を得た。

誘導されるストレス物質の定量：ストレス処理を行ったオオムギ葉身(2~3枚)を熱メタノール(5ml)で10分間抽出し、抽出後蒸留水(1ml)を加えた。これをあらかじめ80%メタノールで平衡化させたSEP-PAK C18カートリッジに通し溶出液を得、さらに80%メタノール(10ml)で溶出させた分を加えて濃縮した。この濃縮物を蒸留水に溶解し、HPLCの試料とした。HPLCのカラムはWAKOSIL-II 5C18HG, 4.6×150mmを用い、6の分析では移動相を0.1%りん酸を含む20%メタノール(流速0.8ml/min)として蛍光検出(励起光290nm, 検出光355nm)をおこなった。また5の分析では、移動相を0.1%りん酸を含む70%メタノール(流速0.8ml/min)としてUV検出(220nm)をおこなった。

オオムギうどんこ病菌に対する抗菌性試験<sup>59)</sup>：被験化合物を蒸留水に懸濁して所定の濃度とし、ここに5×5×2mmの寒天ブロックを浸し24時間保持した。次いで、このブロック上に、接種後7日に葉上で形成されたうどんこ病菌胞子をふりかけ、24時間後の発芽状態を顕微鏡下で観察した。

## 第4章 エンバクのファイトアレキシンの再検討

### 4-1 緒言

病原菌 *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* によりもたらされる冠さび病はエンバクの重要病害で、その発生は世界のエンバクが栽培されている地域のほとんどすべてで認められている。本病による被害の大きさは古くから問題とされており、例えば1934年のチェコスロバキアにおける見積もりによれば、損失は貨車3~4000両分にも相当したという。<sup>60)</sup> このような重大病害に対処するため、エンバクではこれまでに抵抗性品種の育種について膨大な研究が行われ、抵抗性に関与する多くの遺伝子が明らかにされてきた。同定されたエンバクの冠さび病抵抗性遺伝子の一部を、それによって発現される抵抗性の強度とともに表4-1<sup>9)</sup>に掲げる。

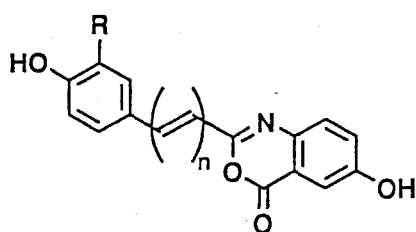
表に見られるように、各抵抗性遺伝子を有する品種はそれぞれ相手の病原菌レースに依存して異なった抵抗反応を示す。Mayamaらはこの関係を解析した結果、病原菌と宿主の組み合わせが不親和性の場合に宿主組織内に顕著に蓄積する物質があることを見いだした。さらにこの物質の生成量と生成速度が抵抗反応の強度とよく相関し、その蓄積が進むにつれて病原菌の宿主内での伸長が抑制されることから、これをエンバクの抵抗性発現に関与するファイトアレキシンであるとし、化学的な解析が行われた。まず、avenaluminと命名されたこのファイトアレキシンは冠さび菌を被験菌とするTLC-バイオオートグラフィー分析により3種の化合物からなることが判明した。次いで、アセチル化物のMS分析およびメタノリシス生成物の分析などによる構造研究が進められた結果、その主要成分 (avenalumin I) に対し 2-[2-(hydroxyphenyl)ethenyl]-6-4 $\mu$ -3,1-benzoxazin-4-one (9) という推定構造が与えられた。<sup>9, 49, 61, 62)</sup> これによりavenaluminは当時まだ事例が少なかったイネ科植物のファイトアレキシンとしてのみならず、初めての含窒素ファイトアレキシンとしても注目されることとなった。

しかしながら、この構造に対しその後Crombieらが疑義を唱えた。<sup>63)</sup> 彼らは合成により得た9のスペクトルデータは天然物のデータと一致せず、天然物のデータはむしろそのベンゾキサジノンヘテロ環が水和開環したアミドで、エンバクの種子に含まれるフェノール性化合物のavenanthramide A

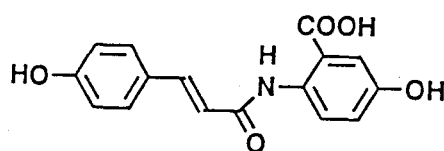
(12)<sup>64)</sup> によく一致することを見いだしたのである。

一方、この 9 と同じ 4*M*-3,1-benzoxazin-4-one 部分構造をもつファイトアレキシンがナデシコ科植物のカーネーションで見つかっている(13)<sup>65)</sup>。そしてこの場合には、そのベンゾキサジノン環が開環したアミド型の化合物(14)も同時に抵抗反応に伴って生成することが認められている。<sup>66, 67)</sup> ただし、これらベンゾキサジノン型とアミド型の化合物の関係については、感染組織を直接MS分析して得られた結果から、ベンゾキサジノン型が実際に組織内に生成する真のファイトアレキシンであり、アミド型はそのベンゾキサジノン型の加水分解により生成するartifactであろうと考えられている。<sup>68)</sup>

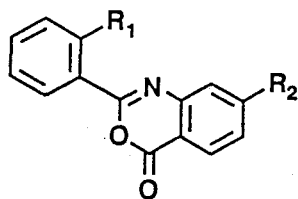
本章では、以上のカーネーションにおける例を参考に、上述のエンバクのファイトアレキシンの構造に関する再検討を行い、それが先に推定されたベンゾキサジノン型の化合物であるのか、Crombieらが提唱したアミド型の化合物であるのか、あるいはその両方であるのかを、実際に冠さび病菌を接種した葉身のHPLC分析により検討した結果について述べる。



- 9: R = H, n = 1  
 10: R = CH<sub>3</sub>O, n = 1  
 11: R = H, n = 2

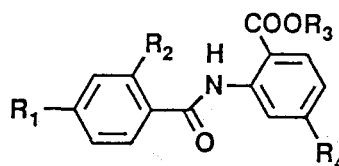


12



13

- R<sub>1</sub> = H, OH  
 R<sub>2</sub> = H, OH, OCH<sub>3</sub>



14

- R<sub>1</sub> = H, OH, OCH<sub>3</sub>  
 R<sub>2</sub> = H, OH  
 R<sub>3</sub> = H, CH<sub>3</sub>  
 R<sub>4</sub> = H, OH, OCH<sub>3</sub>

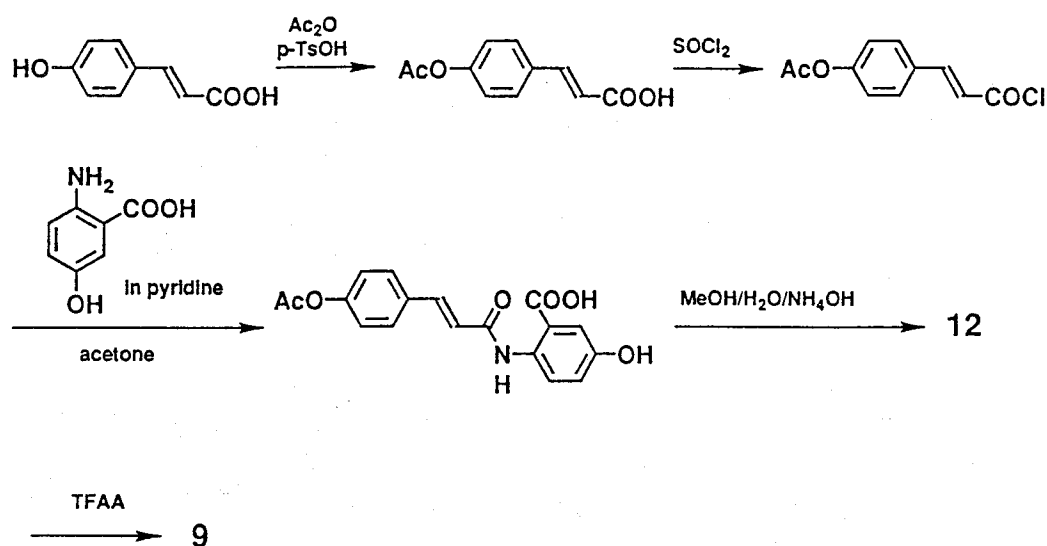
表4-1 エンバクの冠さび病抵抗性<sup>a)</sup>

品種	遺伝子型	反応 <sup>a)</sup>	
		race 203	race 226
Victoria	2	4	1
Ascencao	14	0	0
D-137	35	2	2
CW-491-4	38	1	4
F-366	39	1	4
F-83	40	3	1
F-169	45	4	4
F-290	46	3	3
C. I. 8081A	47	4	4
F-158	48	0	0-1
CW486	50	0	0
Iowa X434	51	0	0
Iowa X421	52	1-2	0
H441	53	0	0
CAV1830	54	3	2
CAV4963	55	3	1
CAV1964	56	1-2	2
H555	57	1-2	1
TAM-0-301	58	0-1	0
TAM-0-312	59	0	0
Coker 234	61	0	0
Shokan 1	Unknown	4	0

a 反応: 0, 抵抗性(肉眼的に変化は認められない); 1, 中度抵抗性(僅かに菌糸の生長がみられるが, 孢子層は形成されない。褐変が顕著に認められる); 2, 中度抵抗性(菌糸生長が若干みられ, 小さな孢子層の形成がある。褐変もみられる); 3, 中度抵抗性(小さな孢子層が多数形成され, 褐変は少ない); 4, 感受性(褐変はみられず, 盛んな孢子形成が認められる)

## 4-2 結果

冠さび病菌を接種したエンバク葉身に生成しているファイトアレキシンを HPLC により分析するために、ベンゾキサジノン型およびアミド型化合物それぞれの標準品を合成した (scheme 1)。ここでアミド型の標品 12 は Collins の方法<sup>64)</sup>に従い、*p*-coumaric acid と 5-hydroxyanthranilic acid とを用いて調製し、得られた 12 についてさらに無水トリフルオロ酢酸を脱水剤として環を形成させてベンゾキサジノン型の標品 9 を得た。両標品は逆相系 HPLC で容易に同時分析することが可能であった。



Scheme 1

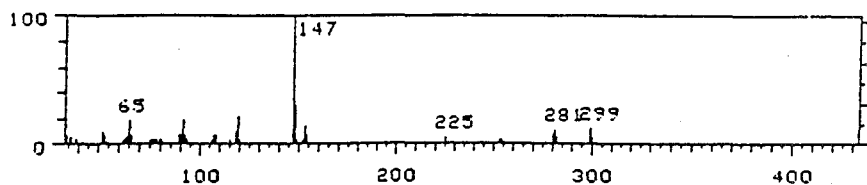


図4-1 Avenanthramide A( 12 )のEI-MSスペクトル

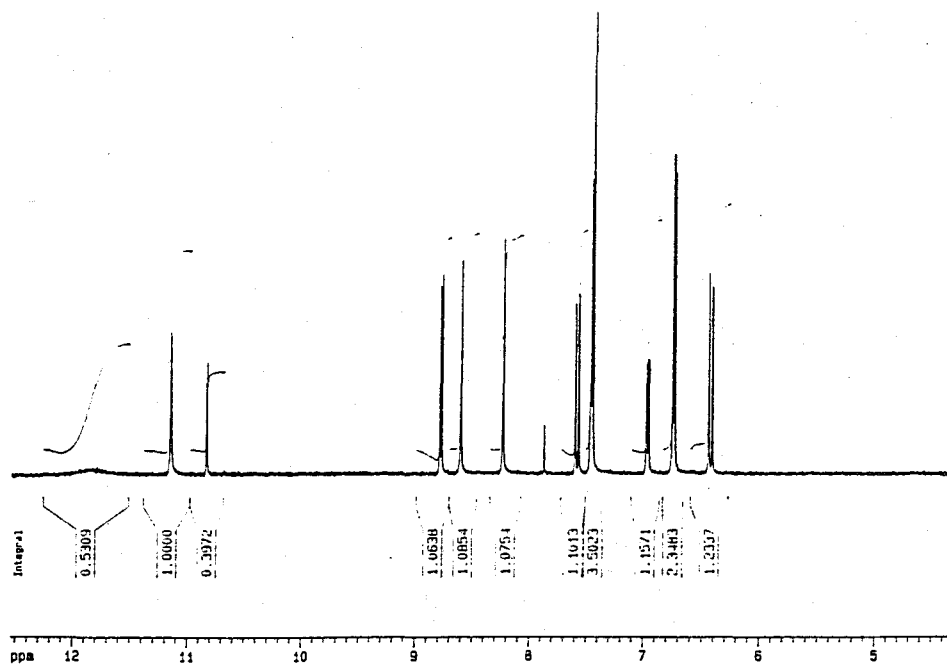


図4-2 Avenanthramide A( 12 )の<sup>1</sup>H-NMRスペクトル



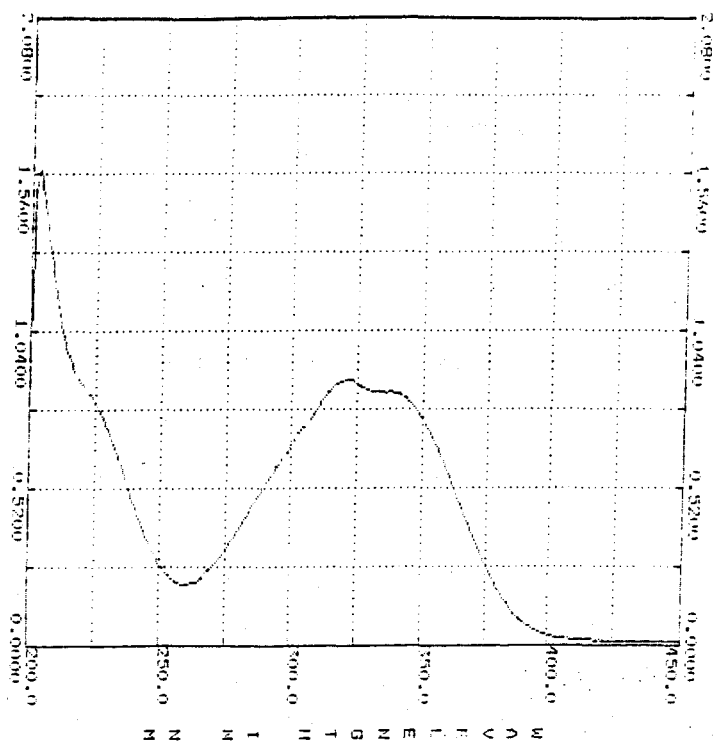


図4-3 Avenanthramide A ( 12 )のUVスペクトル (濃度10ppm, 溶媒メノール)

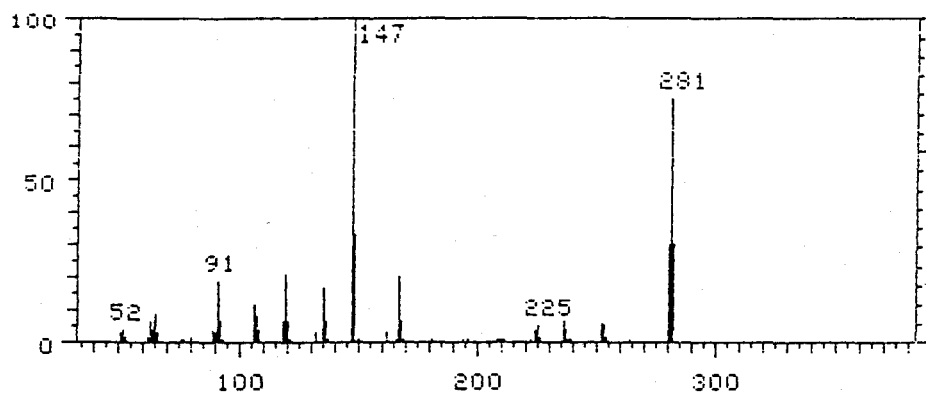


図4-4 Avenalumin 1 ( 9 )のEI-MSスペクトル

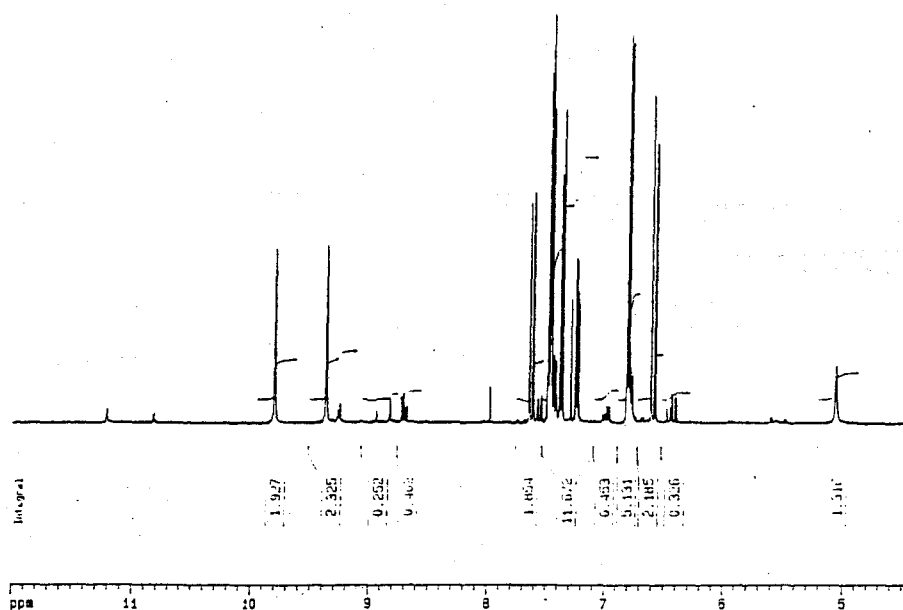


図4-5 Avenalumin 1(9)の<sup>1</sup>H-NMRスペクトル

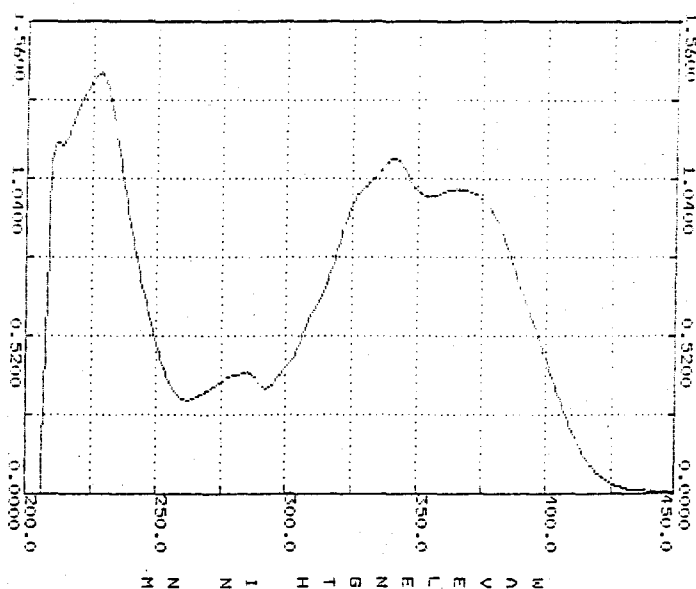


図4-6 Avenalumin 1(9)のUVスペクトル (濃度10ppm, 溶媒メタノール+THF)

次に、エンバク（品種：勝冠1号）の第1葉に冠さび病菌の夏胞子を接種し、48～72時間後に葉身を熱メタノールで10分間抽出して、これをHPLCで分析した。この結果、不親和性の病原菌を接種した葉身の抽出液を分析して得られたクロマトグラム上には、親和性菌を接種した場合には見られない3つのピークが特徴的に検出され（図4-7）、以前にTLCを用いて分析された結果が再確認された。

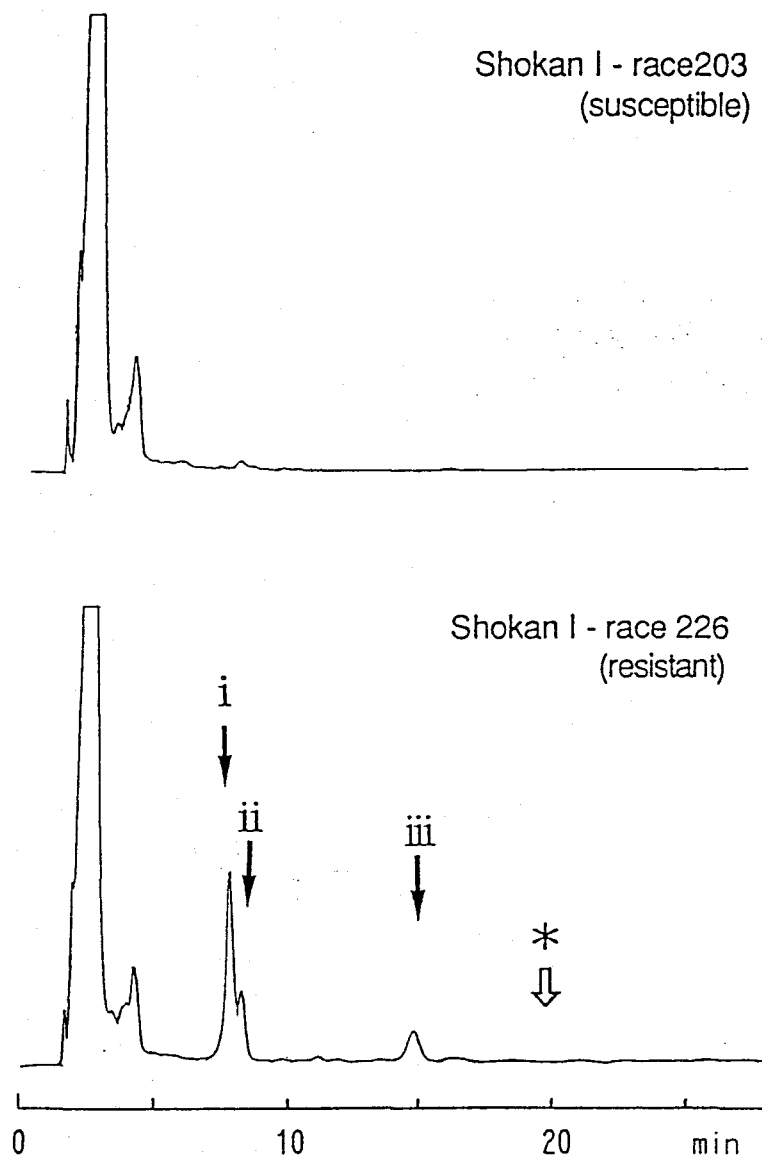
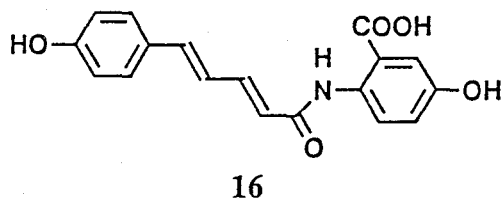
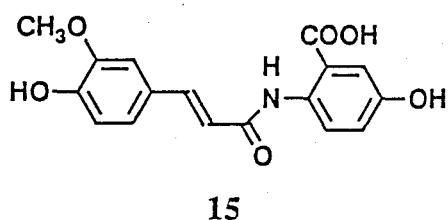


図4-7 冠さび病菌を接種したエンバク葉身抽出物のHPLCクロマトグラム

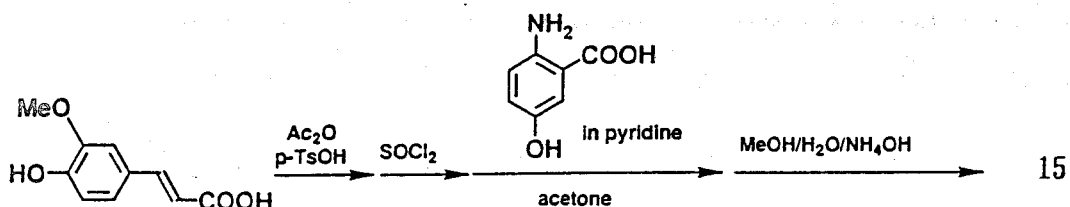
ここで、図4-1の主要ピーク i を与える化合物について分取を行い、その保持時間とUVスペクトルを先に調製した標品と比較したところ、アミド型の 12 とよい一致が見られた。ベンゾキサジノン型の 9 は、クロマトグラム上で全く検出されなかった(図中\*印を付した部分)。また、このとき葉身の抽出溶媒としてアセトンやアセトニトリルのような非プロトン性溶媒を用い、分析過程における 9 の分解を抑制しても同様の結果が得られたことから、エンバクの葉身には可溶性の 9 は生成していないものと考えられた。

つづいて、図4-1に見られる副ピーク ii および iii について検討を加えた。以前の構造研究では、不親和性菌の接種時に誘導されるファイトアレキシンの副成分についても、9 と同様にアセチル化物のMS分析とメタノリシス生成物の同定にもとづいて推定がなされ<sup>69)</sup>、それぞれ 10 および 11 のベンゾキサジノン型の構造が導かれた。しかし、上述の 9 についての検討結果から類推して、これらの副成分もそれぞれ相当するアミド型の化合物 15 および 16 ではないかと考えられた。

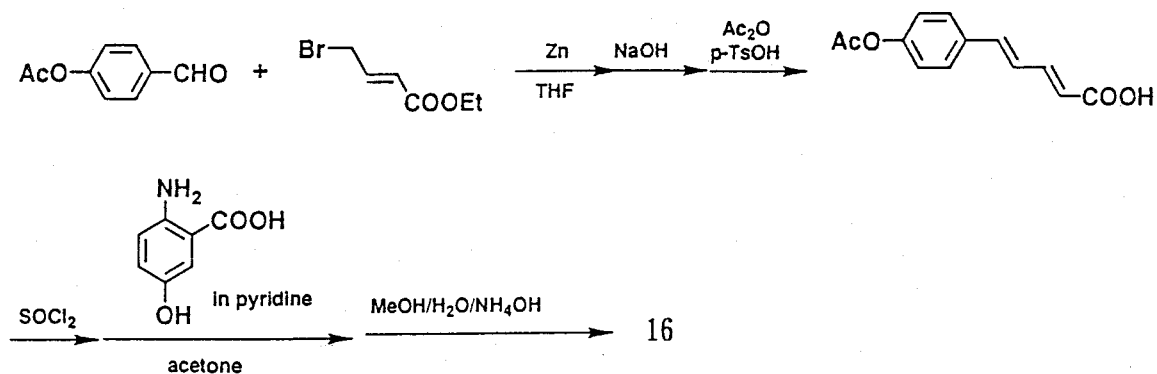


これを確かめるため、先と同様に 15 および 16 の標品を調製し、接種葉のHPLC分析を行った。15 はscheme 2に従いferulic acidと5-hydroxyanthranilic acidから調製した。<sup>64)</sup> 一方 16 はscheme 3に従い、まずアベナルミン酸 (5-(4-hydroxyphenyl)-2,4-pentadienoic acid) <sup>70)</sup> を合成した後、これを5-hydroxyanthranilic acidと縮合させて調製した。得られた2つの標品を用いて接種葉のHPLC分析を行った結果、ピーク ii および iii を与える化合物はそのクロマトグラフィー上での保持時間とUVスペクトルがそれぞれ 15 および 16 とよく一致し、このことからエンバクのファイトアレキシンの副成分もアミド型の化合物であると結論した。この化合物 15 は、12 と同じくエンバク種子のフェノール性成分として報告されているavenanthramide Bである。16 についてはこれまで文献記載がなく、avenanthramide Lと命名し

た (avenanthramide C-Eについては文献64を, またF-HおよびKについては文献71を参照のこと)。なお, 16 の類縁化合物としては, アントラニル酸部分の4位に水酸基をもつ化合物が同じくエンバクの種子から見つかっている。



Scheme 2



Scheme 3

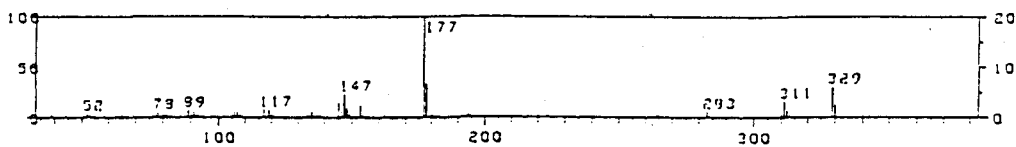


図4-8 Avenanthramide B( 15 )のEI-MSスペクトル

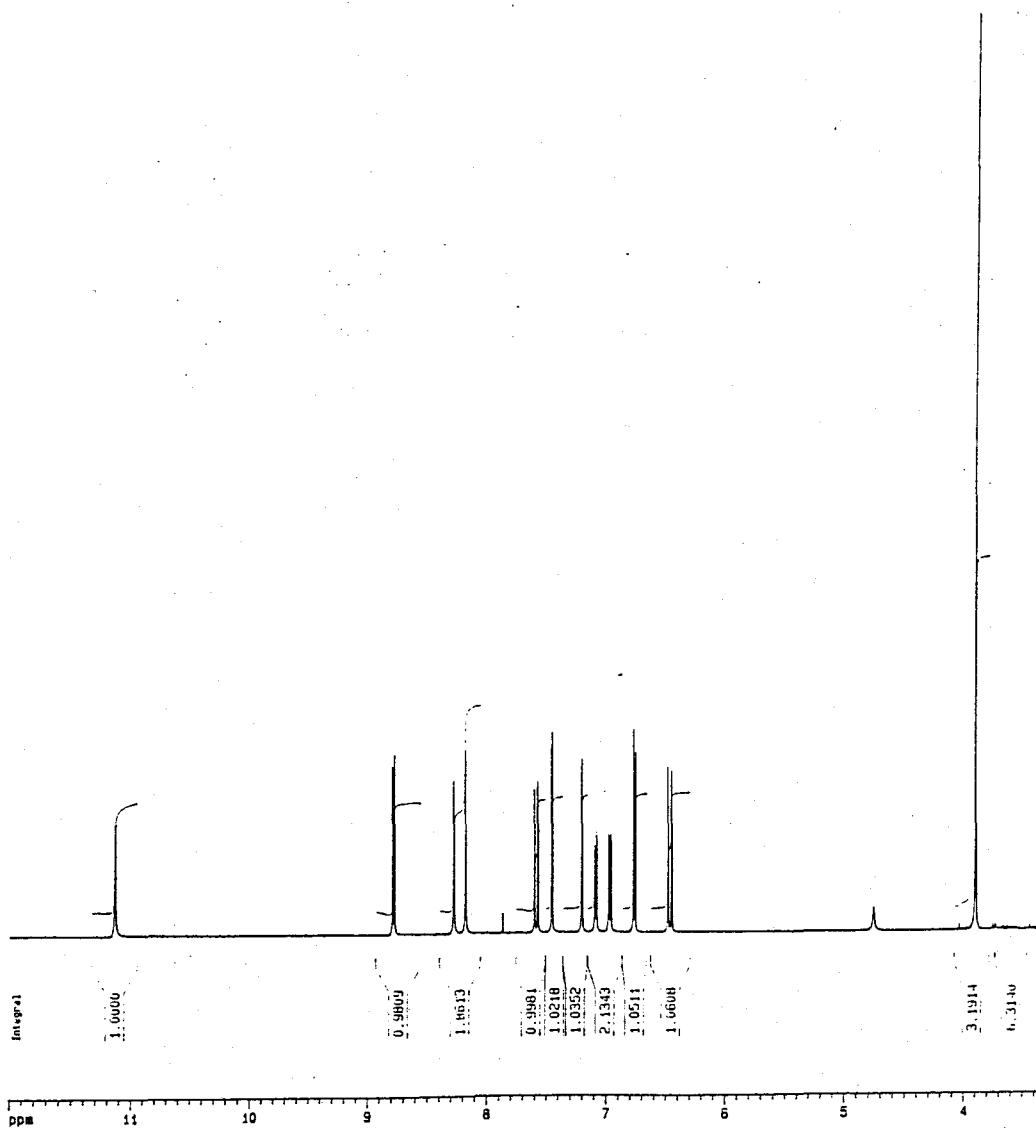


図4-9 Avenanthramide B( 15 )の<sup>1</sup>H-NMRスペクトル

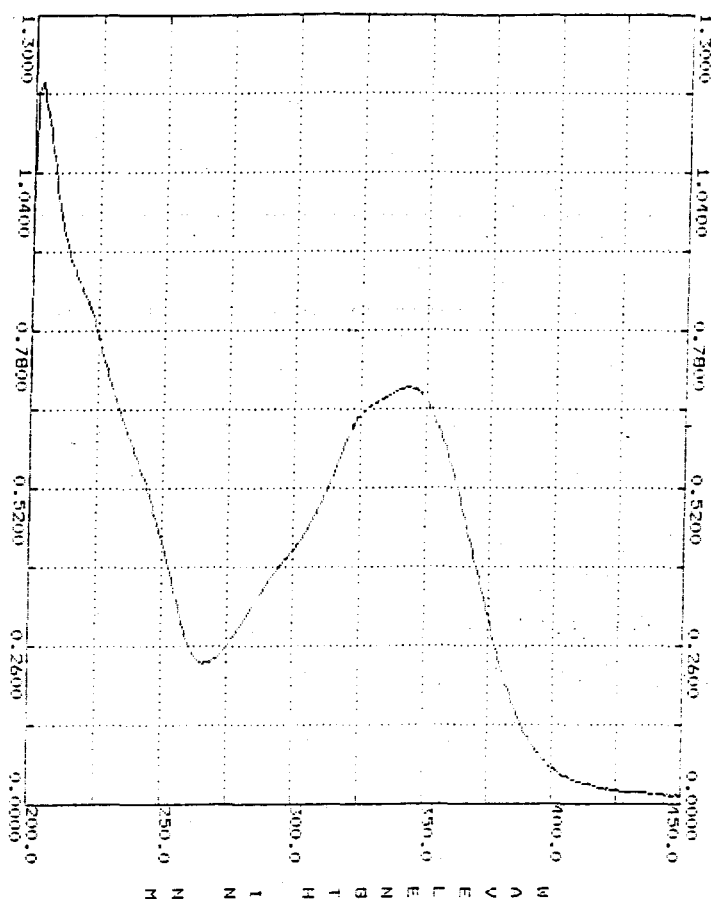


図4-10 Avenanthramide B( 15 )のUVスペクトル (濃度10ppm, 溶媒メタノール)

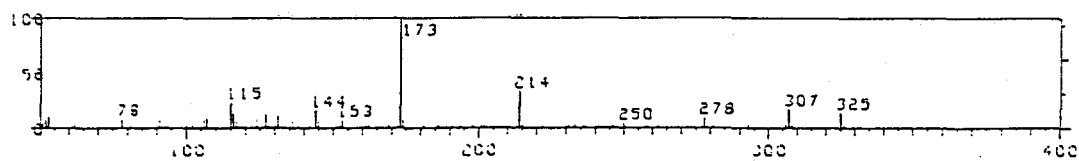


図4-11 Avenanthramide L( 16 )のEI-MSスペクトル

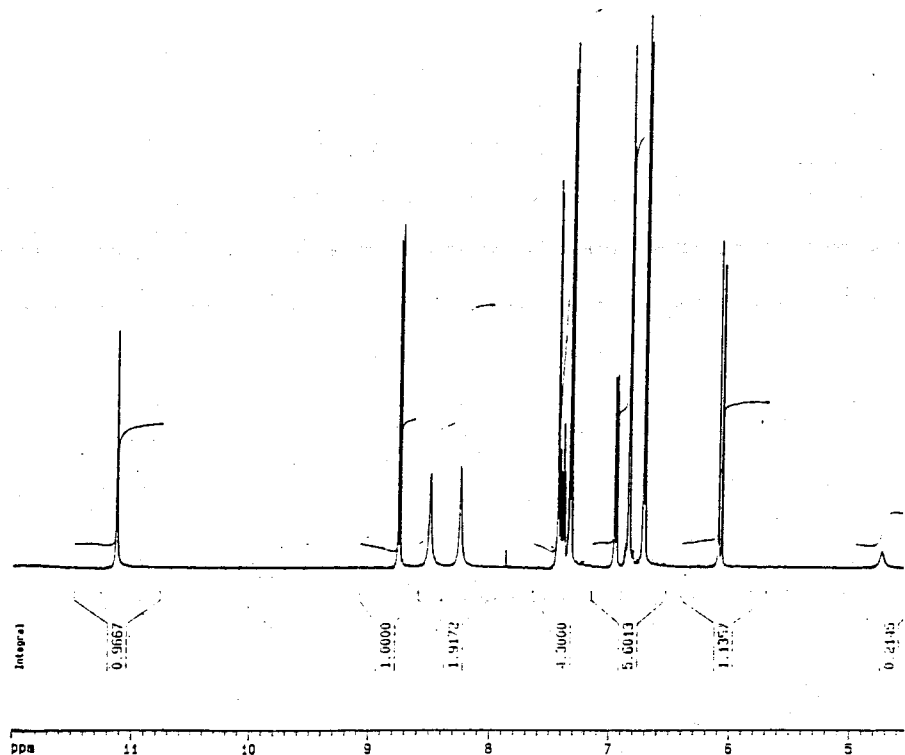


図4-12 Avenanthramide L( 16 )の $^1\text{H}$ -NMRスペクトル

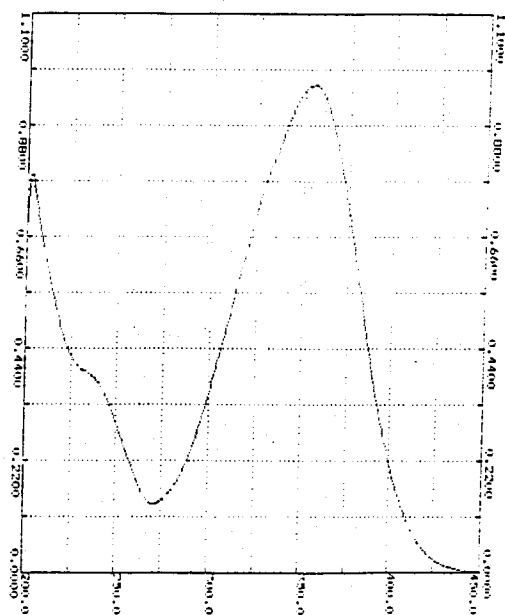


図4-13  
Avenanthramide L( 16 )の  
UVスペクトル  
(濃度5ppm, 溶媒メタノール)



#### 4-3 考察

エンバクのファイトアレキシンについて再検討を行った結果、病原菌を接種した葉身中に検出される化合物はこれまで提唱されていたベンゾキサジノン型の化合物ではなく、アミド型の化合物であることが判明した。一般にベンゾキサジノン類は水中では不安定であるとされている。しかし予備実験として植物における生理的pH条件<sup>72)</sup>と同じ緩衝液中で行った加水分解速度の測定結果からは、9の半減期がpH 5で20.6時間、またpH 7で11.2時間と求められ(データは示さない)、この程度の分解速度ならば、もし実際に葉身で9が生成しているのであれば、全く検出されないということは考えにくい。従って今回HPLC分析で認められたアミド型の3種の化合物は、葉身内で生成したベンゾキサジノン型の化合物の加水分解産物ではないと結論すべきである。以前ファイトアレキシンとして報告されたベンゾキサジノン型の構造は、解析過程でのアセチル化により生成したartifactをもとに推定されたものであろうと考えられる。

以上のようにエンバクでベンゾキサジノン型の化合物が検出されなかったことは、avenaluminおよびavenanthramideに構造類似のファイトアレキシンをもつカーネーションの場合と対照的である。すなわち、カーネーションでは13および14のベンゾキサジノン型およびアミド型両方の化合物が、病原菌接種した植物体のアセトン抽出物に検出されている。<sup>65-67)</sup>さらには導管組織中ではこのアセトン抽出物中よりもベンゾキサジノン型の化合物の比率が高いことから、ベンゾキサジノン型の化合物が真のファイトアレキシンであり、アミド型の化合物はその加水分解によるartifactであらうとされている。<sup>68)</sup>

不親和性の冠さび病菌を接種したエンバクの葉身では、組織の顕著な蛍光化が観察され、その蛍光スペクトルはavenaluminのスペクトルによく一致する。<sup>73)</sup>これに対し、今回標品として得たアミド型のavenanthramide類は蛍光性を示さず、この現象を説明できない。これらのことを考慮すれば、今回は検出できなかったものの、エンバクでもカーネーションの場合と同じくベンゾキサジノン型の化合物が組織中に生成し、不溶性の結合形化合物として存在している可能性も現時点では否定しきれない。今後、より非破壊的な分析法を開発し、これらの化合物の存在状態を検討していく必要があると思

われる。

結論として、本研究によりエンバクのファイトアレキシンは、アミド型の 12 および 15, 16 であることが明らかになった。これらのavenanthramide類はエンバクの種子のフェノール成分であるが、幼苗の葉身にはそれらの存在は認められず、不親和性の病原菌との相互作用によってはじめて誘導される。このように種子に含まれる成分がファイトアレキシンとなる例としては、イネにおけるモミラクトン<sup>74)</sup>をあげることができる。

#### 4-4 実験の部

生物材料：エンバク（品種，勝冠1号）種子は神戸大学農学部真山滋志助教授より供与していただき，バーミキュライト中に播種後人工気象器内で1日16時間の照明下，20～21℃で栽培し，播種後7日の幼苗の葉身に冠さび病菌の胞子を接種した。接種に用いた菌株レース203（親和性）および226（不親和性）は同じく神戸大学真山滋志助教授より供与していただいた。

標品の合成：avenanthramide A (12)；Collinsの方法<sup>64)</sup>に従い，4-hydroxycinnamic acid (Aldrich製)から調製した酸クロライドを5-hydroxy-anthranilic acid (Aldrich製)と縮合させた。アセチル基を除去後，Sephadex LH-20カラムクロマトグラフィー（展開溶媒，クロロホルム／シクロヘキサン／メタノール／酢酸＝50/35/10/5）で精製し，さらにメタノール－1%酢酸水から再結晶させて目的物を淡黄色結晶として得た。mp 277–8℃；UV (MeOH)  $\lambda_{\max}(\log \epsilon)$ ：321(4.42)，337(4.40)；IR  $\nu_{\max}(\text{KBr})\text{cm}^{-1}$ ：3400–2800(br)，1655，1605，1515；EI-MS  $m/z$ ：299( $M^+$ )，281，153，147，119，91；Thermospray LC-MS  $m/z$ ：300( $M+H^+$ )；<sup>1</sup>H-NMR  $\delta$  (THF- $d_8$ )：6.43(1H, d,  $J=15.4\text{Hz}$ )，6.75 (2H, d,  $J=8.5\text{Hz}$ )，6.96 (1H, dd,  $J=9.0, 3.0\text{Hz}$ )，7.45 (1H, d,  $J=3.0\text{Hz}$ )，7.46 (2H, d,  $J=8.5\text{Hz}$ )，7.58 (1H, d,  $J=15.4\text{Hz}$ )，8.78 (1H, d,  $J=9.0\text{Hz}$ )

avenalumin 1 (9)；12 (10mg)をTHF (1ml)に溶解し，無水トリフルオロ酢酸 (0.5ml)を加えた。1時間攪拌後，生成物をシリカゲルTLC（クロロホルム／2-プロパノール＝90/5）およびHPLC（カラム，COSMOSIL 5C18-AR；移動相，メタノール／1%酢酸水＝1/1）で生成し，黄色固形物 (4.8mg)を得た。UV (MeOH)  $\lambda_{\max}(\log \epsilon)$ ：341(4.49)，365(4.45)；IR  $\nu_{\max}(\text{KBr})\text{cm}^{-1}$ ：3270，1765，1640(sh)，1595；EI-MS  $m/z$ ：281( $M^+$ )，181，167，147，91；<sup>1</sup>H-NMR

$\delta$  (THF- $d_8$ +DMSO- $d_6$ ): 6.54 (1H, d,  $J=16.0$ Hz), 6.81 (2H, d,  $J=9.0$ Hz), 7.25 (1H, dd,  $J=8.5, 3.0$ Hz), 7.38 (1H, d,  $J=8.5$ Hz), 7.46 (1H, d,  $J=3.0$ Hz), 7.48 (2H, d,  $J=9.0$ Hz), 7.64 (1H, d,  $J=16.0$ Hz)

avenanthramide B (15); 4-Hydroxy-3-methoxycinnamic acid (和光純薬製)を出発物質とし, 12 と同様に調製した。Sephadex LH-20カラムクロマトグラフィーによる精製後, さらにHPLC (カラム, COSMOSIL 5C18AR; 移動相, アセトニトリル/1%酢酸水=1/3) により精製を行い, メタノール-1%酢酸水から再結晶させて淡黄褐色結晶を得た。mp 243-4°C; UV(MeOH)  $\lambda_{\max}$  ( $\log \epsilon$ ): 320sh(4.32), 342(4.36); IR  $\nu_{\max}$  (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3500 - 3000(br), 1660, 1600, 1515; EI-MS  $m/z$ : 329( $M^+$ ), 311, 283, 177, 153, 177, 117; Thermospray LC-MS  $m/z$ : 330( $M+H^+$ );  $^1\text{H-NMR}$   $\delta$  (THF- $d_8$ ): 3.89 (3H, s), 6.46 (1H, d,  $J=15.5$ Hz), 6.76 (1H, d,  $J=8.2$ Hz), 6.96 (1H, dd,  $J=9.0, 3.0$ Hz), 7.08 (1H, dd,  $J=8.2, 1.8$ ), 7.20 (1H, d,  $J=1.8$ ), 7.45 (1H, d,  $J=3.0$ Hz), 7.58 (1H, d,  $J=15.5$ Hz), 8.78 (1H, d,  $J=9.0$ Hz)

avenanthramide L (16): まず, Collinsらの方法<sup>70)</sup>を改変して, アベナルミン酸 (5-(4-hydroxyphenyl)-(2E, 4E)-2, 4-pentadienoic acid) を合成した。4-acetoxymethylbenzaldehyde (Aldrich, 4.3ml) と ethyl 4-bromocrotonate (Aldrich, 3.65ml) を乾燥させたTHFに溶解し, その一部を亜鉛粉末 (2g) に加えて穏やかに加温した。反応が開始したあと, 反応液を攪拌しながら残りのTHF溶液をゆっくり滴加し, 終了後さらに1時間加熱攪拌した。冷却させた反応液に10%硫酸水溶液を加えて加水分解後, ベンゼンで抽出しシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分画して得られたethyl 5-(4-acetoxymethylphenyl)-2, 4-pentadienoateを含む画分について, アルカリ加水分解, 次いでp-トルエンスルホン酸を触媒とする無水酢酸によるアセチル化を行って4-(acetoxymethylphenyl)-2, 4-pentadienoic acid (150mg)を得た。この酸を 12 の場合と同じくクロライドとし, 5-hydroxyanthranilic acidと縮合させ, アセチル基を除去後HPLC (カラム, WAKOSIL II 5C18HG, 移動相, メタノール/1%酢酸水=3/2) による精製を行い, さらにメタノール-1%酢酸水から再結晶させて黄色結晶 (29mg) を得た。mp 267-9°C; Anal. Found: C, 65.58; H, 4.91; N, 3.98% Calcd. for  $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{NO}_5 \cdot 1/3\text{CH}_3\text{OH}$ : C, 65.60; H, 4.80; N, 4.17%; UV(MeOH)  $\lambda_{\max}(\log \epsilon)$ : 355(4.80); IR  $\nu_{\max}(\text{KBr})\text{cm}^{-1}$ : 3500-2800 (br), 1650, 1595, 1530, 1510; EI-MS  $m/z$ : 325( $M^+$ ), 307, 278, 214, 173.

162; Thermospray LC-MS  $m/z$ : 326( $M+H^+$ );  $^1H$ -NMR  $\delta$  (THF- $d_8$ ): 6.08 (1H, d,  $J=14.8$ Hz), 6.72 (2H, d,  $J=8.6$ Hz), 6.85 (2H, m), 6.96 (1H, dd,  $J=9.1, 3.0$ Hz), 7.33 (2H, d,  $J=8.6$ Hz), 7.41 (1H, dt,  $J=14.8, 5.1$ Hz), 7.44 (1H, d,  $J=3.0$ Hz), 8.75 (1H, d,  $J=9.1$ Hz)

接種葉の分析: 接種葉は熱メタノールで10分間抽出後、抽出液を4倍量の水で希釈してSEP-PAK C18カートリッジにアプライすることにより分析対象物を吸着させ、これをメタノールで溶出させてHPLC用の試料とした。HPLCはカラムとしてCOSMOSIL 5C18AR (4.6×150mm), 移動相としてメタノール/1%酢酸水=55/45 (流速0.8ml/min) を用い、340nmのUV吸収で検出した。検出されたピークについては、さらに相当するカラム溶出液を分取し、そのUVスペクトルを測定した。

## 第5章 エンバクにファイトアレキシンを誘導するエリシターとその作用

### 5-1 緒言

一般に、ファイトアレキシンの誘導過程は、①宿主植物による病原の認識、②認識結果の細胞内への伝達、③細胞内でのファイトアレキシン合成系の活性化の3段階に分けて考えることができる。

このうちまず①の段階では、病原菌の生産する何らかの成分が宿主による認識にとって大きな役割を果たすものと推察され、実際にこれまでファイトアレキシン蓄積などの抵抗反応を誘導する物質（エリシター）が多くの病原菌から分離されている。その実例に関しては秀れた総説<sup>75)</sup>があるので詳細は略すが、それらは、糖質、ペプチド、脂質など多岐にわたり、さらには病原菌由来でない種々の化学物質や物理的な処理も同様のエリシター活性を示すことが明らかにされている。しかし現時点で知られているエリシターの多くはその作用が非特異的で、抵抗性の発現に関して実際に観察される宿主-病原菌間の特異性を説明できない。従って、感染の場において認識に関わっているエリシターの活性本体については、まだまだ多くの検討の余地が残っている。ただし近年いくつかの系で、いわゆる非病原性遺伝子の産物あるいはそれと密接な関係をもつ「特異的エリシター」に関する研究が大きな進展をみせ<sup>76,77)</sup>、この過程の解明に迫るものとして注目されている。

②のシグナル伝達の過程については、種々の系を用いた解析からcAMP<sup>78)</sup>、活性酸素<sup>79)</sup>、Caイオン<sup>80)</sup>、ジャスモン酸<sup>46)</sup>などがシグナルのセカンドメッセンジャー候補として提唱されている。しかしながらこの過程の研究例はまだ不十分であり、この機構がすべての植物に共通であるのか、あるいは種に依存して異っているのかも不明で、詳細については今後解明されるべき点が多い。

③は前の2つの過程に比べれば研究の進んでいる部分で、なかでもフラボノイド系（マメ科）とテルペン系（ナス科）のファイトアレキシンについてはその生合成に関する詳しい研究が行われ、多くの知見が得られている。それらの示すところによれば、ファイトアレキシン生合成で鍵となる酵素は、病原菌の感染あるいは種々のエリシター処理によって誘導的にde novo合成されるものであり、従って抵抗反応の誘導は宿主遺伝子の動的な発現制御を

含むプロセスであることが示唆されている。しかし、ファイトアレキシンの構造がそれぞれの植物により異なり、さらには同じ植物ではその抵抗性遺伝子に関係なく同じファイトアレキシンが誘導されることを考えると、植物における抵抗性の発現機構の理解にとって重要なのはこの過程そのものよりも、この過程を活性化する①や②の過程であることは明らかである。しかるに①や②の過程には、上述のように未だ不明な点が多く、結果としてファイトアレキシンの誘導機構に関しては本研究で対象としているイネ科のみならず、植物全般について未解明の部分が多いのが現状であると言わざるを得ない。

さて、前章において、エンバクのファイトアレキシンの構造を再検討した結果、それらが桂皮酸誘導体とアントラニル酸誘導体の縮合した比較的簡単な構造のアミド化合物であることを明らかにした。このような構造の単純さは、生合成過程の解析を容易にすると考えられ、またその遺伝的なバックグラウンドもよく整理されていることから、エンバクは、上述のようなファイトアレキシン誘導に関する未知の部分に迫るための有用な実験材料のひとつであると言える。しかし、エンバクの冠さび病菌は絶対寄生菌で培養が不可能なため、その成分研究がきわめて難しく、これが両生物間の物質レベルでの相互作用の解析を困難なものにしている。そこで、本研究ではまずエンバク側のシグナル認識からファイトアレキシン合成に至る過程について検討することとし、そのためのプローブとして用いることのできるようなエリシターを求めて検索を行った。活性の認められたエリシターについては、それらの作用を誘導するavenanthramide類の組成を指標として比較し、またその組成のちがいをもたらす要因について考察を加えた。以下にその結果を述べる。

## 5-2 エリシターの検索

エンバクにおけるファイトアレキシン誘導を解析するためのプローブを求めて、これまで他の植物でエリシター活性が認められている化合物あるいは物理的な処理について、そのエンバクにおけるavenanthramide類の誘導活性を検定した。活性の検定には、エンバクの第一葉の裏表皮を剥ぎ、その切片を被験試料の水溶液にうかべる方法、あるいは幼苗に直接試料の水溶液を噴霧する方法のいずれかを処理法を用いた。前者の処理法の場合には試料液をそのまま、また後者の場合には葉身を熱2%酢酸水で抽出して、HPLC分析する

表5-1 エンバクに対してファイトアレキシンを誘導するエリシター

供試化合物／処理	活性	毒性
<b>糖質</b>		
Chitin (0.2mg/ml)	(+)	—
N-Ac-chitopentaose (1mg/ml)	+	—
Chitopentaose (0.1mg/ml)	+	+
Laminarin (1mg/ml)	—	—
Lamaripentaose (1mg/ml)	—	—
<b>金属イオン</b>		
Ag <sup>+</sup> (400ppm, spray)	+	+
Cd <sup>2+</sup> (400ppm, spray)	+	+
Cu <sup>2+</sup> (1ppm)	±	+
Ca <sup>2+</sup> (100ppm)	—	—
<b>植物毒素</b>		
Victorin (1ng/ml)	+	+
Ophiobolin (50ppm)	—	+
Cochlioquinone A (50ppm)	—	+
<b>生育阻害剤</b>		
DCMU (1mg/ml, spray)	—	+
Glyphosate (100倍液)	—	+
Diquat (10 <sup>6</sup> 倍液)	—	+
<b>物理的ストレス</b>		
UV照射	—	±
傷害	—	±
浸透圧 (0.9M sorbitol)	—	—
酸 (pH 4)	—	+
<b>その他</b>		
Methyl jasmonate (100ppm)	—	+
Oxygenated fatty acid (100ppm)*	—	+

\* リノール酸をリポキシゲナーゼで処理したもの<sup>17)</sup>

ことにより生成したavenanthramide類を検出した。

検定した化合物、およびその活性を表5-1に示す。表にはあわせて、その処理によりエンバクの葉身に何らかの傷害がもたらされたかどうかを肉眼的に観察した結果も示した。まず糖質の化合物について調べた結果、キチンに僅かながら活性が認められ、そのオリゴマーである*N*-acetylchitopentaoseに有意な活性がみられた。また*N*-アセチル基のないキトサンのオリゴマー、chitopentaoseにも活性がみられた。他の多くの植物で活性の認められている $\beta$ -1,3グルカン (laminarin) およびそのオリゴマーにはavenanthramide誘導活性はみられなかった。

次に金属イオンについて検討したところ、銀およびカドミウムイオンに誘導活性が認められた。

エンバクのビクトリア葉枯病菌が生産する宿主特異的毒素victorinは、エンバクの冠さび病抵抗性遺伝子Pc-2をもつ品種に対して極めて低濃度でavenanthramide類を誘導する。<sup>8,11)</sup> このことを考慮して、一連の病原菌由来の植物毒素および合成生育阻害剤についてその活性を検定したが、いずれもavenanthramide類を誘導せず、victorinの活性は特異性の高いものであることが解った。

UV照射、傷害などの物理的な処理も、avenanthramide類の誘導には無効であった。また近年イネでファイトアレキシン誘導過程におけるシグナル物質と考えられているジャスモン酸のエステル、およびその前駆物質の酸化脂肪酸にも活性は認められなかった。

以上より、キチンとキトサンのオリゴマー、銀とカドミウムイオンおよびvictorinがエンバクにavenanthramide類を誘導することが明らかになったが、これらは、キチンオリゴマーを除いて、いずれもファイトアレキシンの誘導とともに、エンバクに対して何らかの傷害をもたらすことが観察された。キチンオリゴマーでは、処理濃度をあげても顕著な植物毒性はみられなかった。このようなエリシターによる作用の違いについて、さらに次節以下で比較検討をおこなった。



### 5-3 エリシター処理によるavenanthramide類の誘導

前節において、キチンとキトサンのオリゴマー、銀とカドミウムの金属イオンおよびvictorinがエンバクにファイトアレキシンを誘導するエリシター活性を有することを見いだした。しかし、このような化学的に多様な物質が同じメカニズムで植物に作用し、ファイトアレキシンの誘導をもたらしているとは考えにくいところである。これを考慮して、本節ではそれらのエリシターによるavenanthramide類の誘導についてさらに検討を加えた。

エリシターとしてキチンとキトサンのオリゴマー、銀イオンおよびvictorinを用い、それぞれの水溶液に裏表皮を剥いだエンバク葉片を浮かべて（なお、銀イオンエリシターについては表皮を除去して処理すると激しい毒性が発現したので、葉身の切片をそのまま用いた）処理を行い、24時間後に誘導された物質をHPLCで分析した。得られたクロマトグラムを各エリシターごとに図5-1に示す。図に見られるように、供試したエリシターいずれの場合も誘導される主要成分はavenanthramide A（前章 12）であったが、副成分の組成にエリシターによる差異が認められた。すなわち、キチンオリゴマーの場合には副成分としてavenanthramide B（15）とL（16）がよく誘導されたが、それ以外のキトサンオリゴマー、銀イオンおよびvictorinの場合には13と14の誘導が抑制され、かわって未知の成分（UK）の誘導が顕著になった。このような副成分の誘導パターンの違いは、エリシターの植物に対する作用の違いを反映しているものと考えられ、このことからエンバクに対するエリシターはキチンオリゴマーとそれ以外の少なくとも2つのグループに分類できることが示唆された。またこの誘導パターンの違いは前節において観察されたエリシターの毒性の有無とも対応している。なお、ここでみられた未知誘導成分UKはキチンオリゴマー以外のエリシターグループを特徴づける化合物であると言えるが、これはエンバクに不親和性の冠さび病菌を接種した場合には検出されない（図5-2）。逆に、この副成分の誘導パターンからみれば、菌接種葉において観察されるパターンには、キチンオリゴマーによるものとの相似が認められた（図5-1a）。

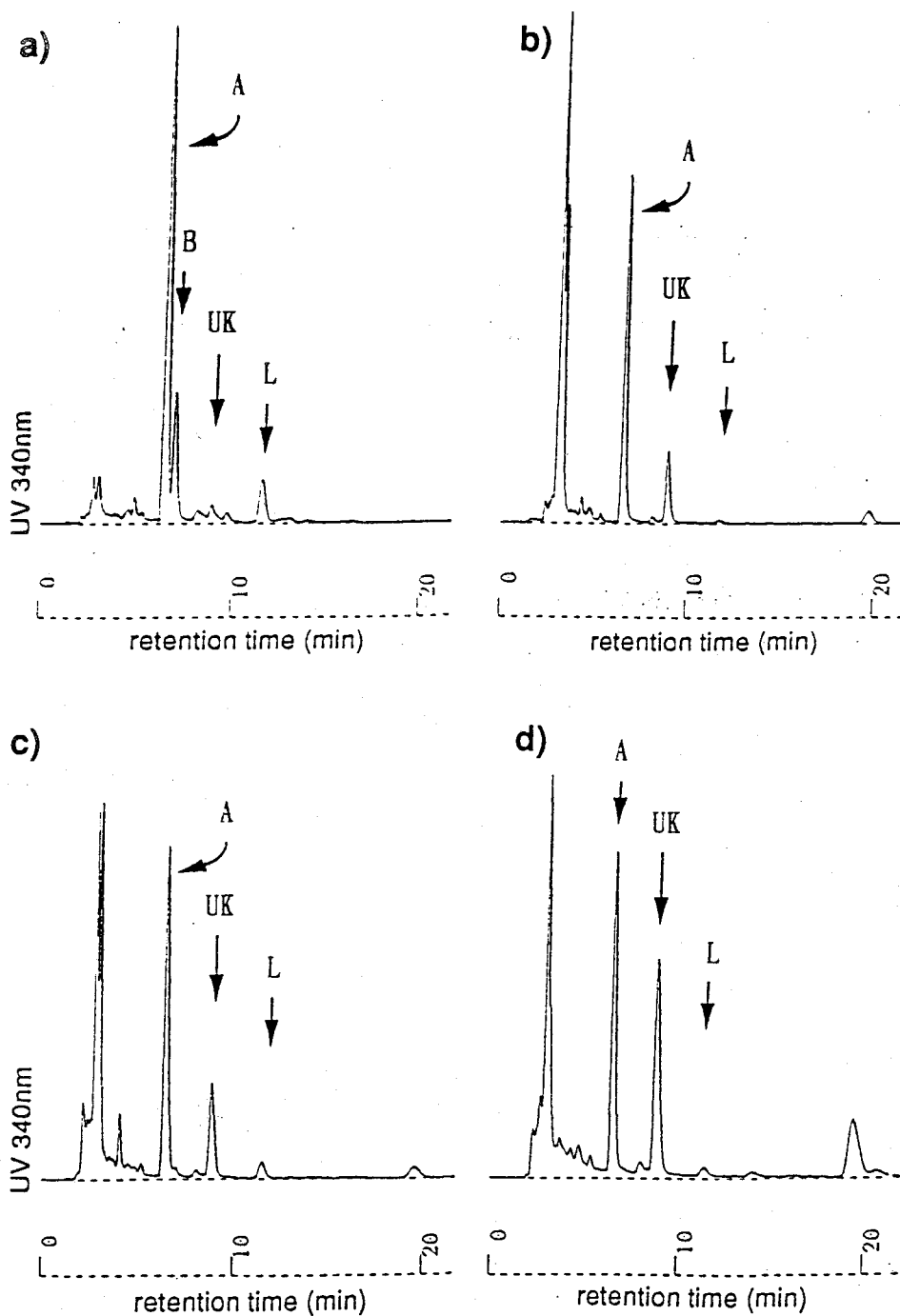


図5-1 エリシターによるavenanthramide類の誘導

エリシター: a) キチンペンタマー (1mg/ml); b) キトサンペンタマー (0.1mg/ml); c) 銀イオン (0.1mg/ml, 以上品種勝冠1号); d) victorin (1ng/ml, 品種Pc-2)

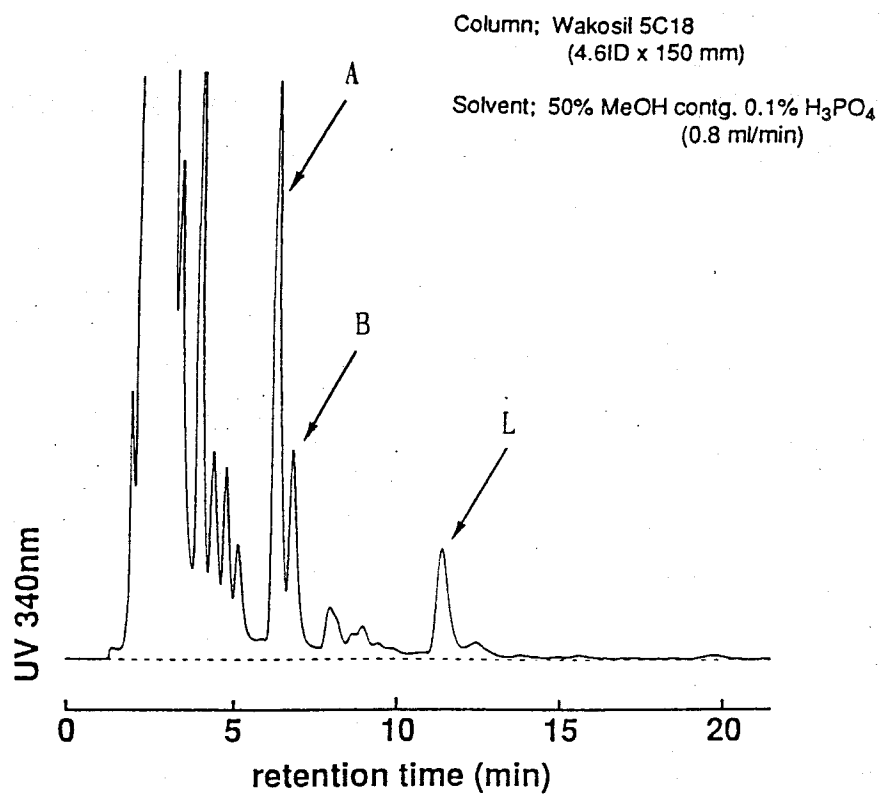


図5-2 冠さび病菌を接種したエンバク葉身抽出物のHPLCクロマトグラム

#### 5-4 Victorinおよび銀イオンによって特徴的に誘導される化合物の同定

前節において、victorinや銀イオンなどの毒性を示すエリシターが、冠さび病菌の接種時にはみられない代謝物をエンバクに誘導することを認めた。この代謝物は一種のストレス化合物とみなすことができるが、その誘導はエンバクに対する先のエリシターの作用と病原菌の作用との違いを反映した結果であると考えられる。本節では、そのような作用の違いの指標となる誘導代謝物の化学構造について検討した結果について述べる。

構造解析のための試料を調製するために、播種後7日のエンバク幼苗（品種：勝冠1号）に、硝酸銀水溶液（1000ppm）を噴霧し2日後にその地上部（700g）を刈り取ってメタノール抽出を行った。抽出物中に目的のストレス化合物（図5-1のUK, 17）が含まれることをHPLCで確認後、これを液-液分配、ODSシリカカラムクロマトグラフィーおよび逆相系HPLCで精製し、17の精製物（15.7mg）を得た。

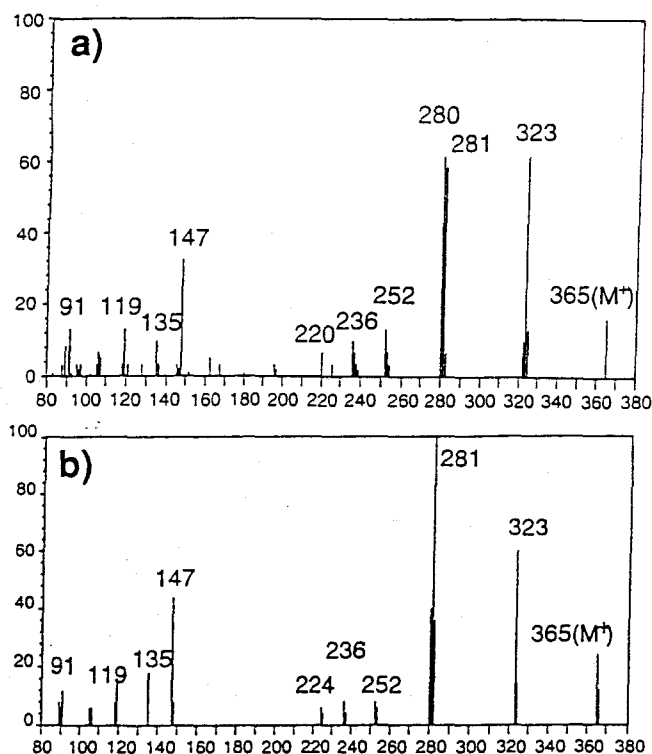


図5-3 ストレス化合物(17)のアセチル化物 (a) とavenanthramide Aアセチル化物 (b) のEI-MSスペクトル

まず、17 のサーモスプレーLC-MSを測定した結果、 $m/z$ 300に擬分子イオン( $M+H^+$ ) が観測され、分子量が299と推定された。さらに無水酢酸によるアセチル化後に得られたEI-MSスペクトルはavenanthramide A( 12 )のアセチル化物のスペクトルと極めてよく似ており、このことから 17 を 12 の異性体であると仮定した。

この仮定のもと、次に $^1H$ -および $^{13}C$ -NMRスペクトルの比較から、17 は 12 と同じ4-ヒドロキシ桂皮酸部分構造 ( $\delta_H$  6.53, 7.59, 6.84 (2H)および7.49 (2H),  $\delta_C$  125.6, 130.1, 115.9, 159.6, 141.4および119.0) を有することが予想された。これを確認するために 17 のアルカリ条件下での加水分解をおこなったところ、予想どおり4-hydroxycinnamic acidを、標品とのHPLC上での挙動およびUVスペクトルの比較により分解生成物として認めることができた。従って、両者の構造の差異はこの桂皮酸部分ではなく、残りのヒドロキシアントラニル酸部分にあるものと考え、 $^1H$ -NMRスペクトル上のこの部分に相当するとみられるシグナル ( $\delta_H$  6.50, 7.95および8.19)に注目した。これらのシグナルは、そのカップリング様式から1,2,4-三置換ベンゼン残基に由来すること示しており、この置換様式から考えてアントラニル酸部分の構造を、4位に水酸基をもつ4-hydroxyanthranilic acidと推定した。

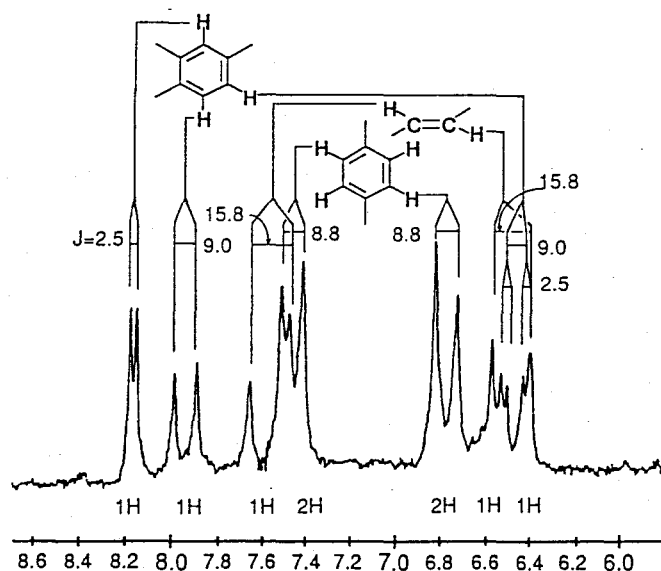
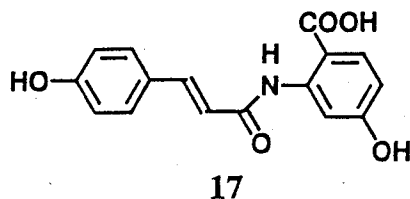
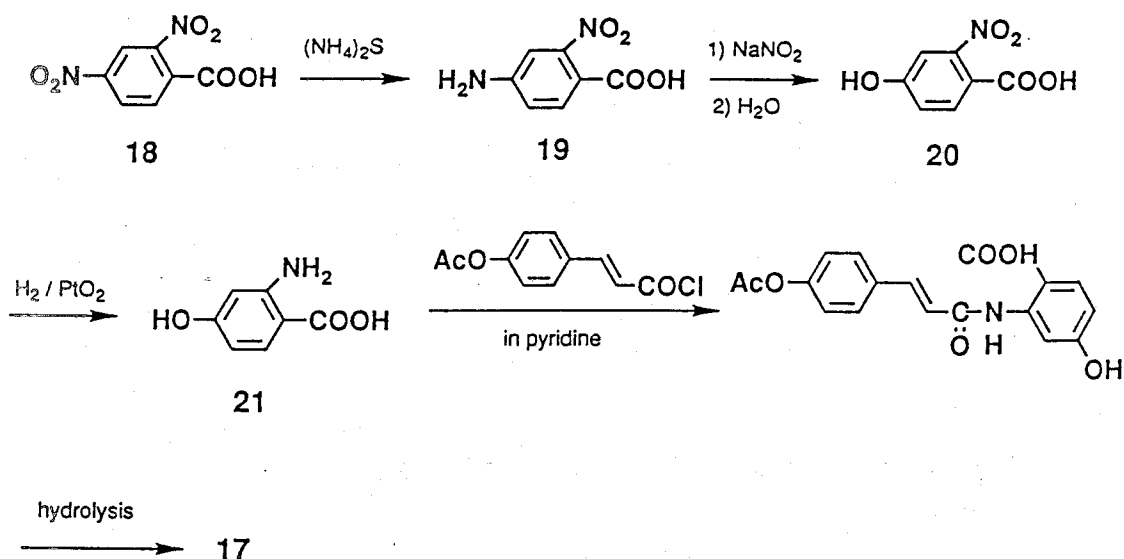


図5-4 ストレス化合物( 17 )の $^1H$ -NMRスペクトル



以上により, 17 の全体構造を *N*-(4-hydroxycinnamoyl)-4-hydroxyanthranilic acid と推定し, これを合成によって確認することとした。

合成は scheme 4 によって行った。すなわち, 2,4-dinitrobenzoic acid (18) を出発物質として3段階の反応で4-hydroxyanthranilic acid (21) を調製し<sup>82, 83)</sup>, これをアセチル化した4-hydroxycinnamic acid のクロライドと縮合させた。次いで, この縮合物アミドをアルカリ条件で処理して脱保護することにより 17 を得た。この合成品の物理化学データ (<sup>1</sup>H-および<sup>13</sup>C-NMR, IR, UV, MS) を天然物のデータと比較したところ, 両者はよく一致し, これにより上記の推定構造が証明された。



Scheme 4

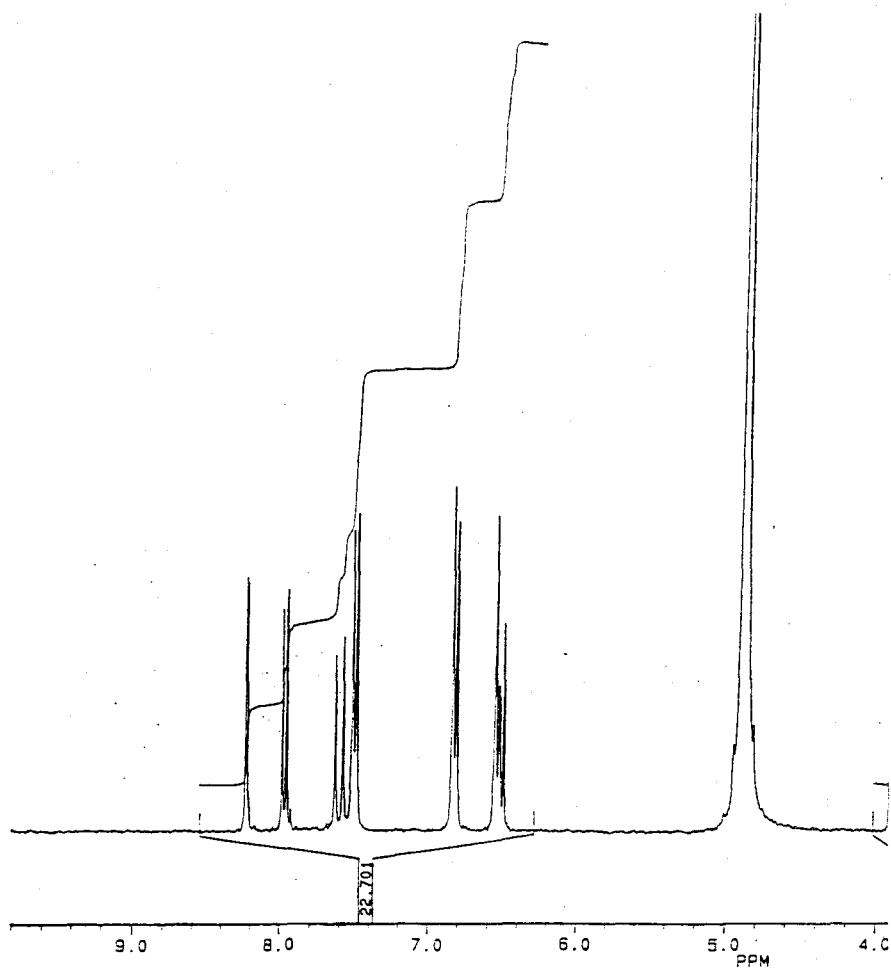


図5-5 合成 17 の $^1\text{H}$ -NMRスペクトル

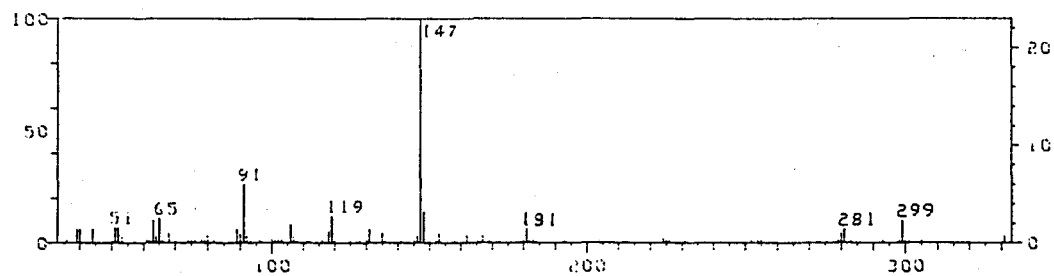


図5-6 合成 17 のEI-MSスペクトル

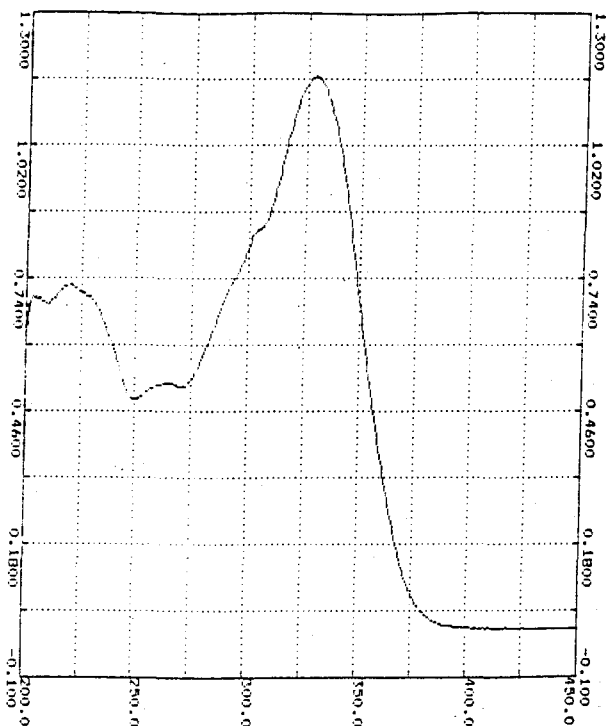


図5-7  
合成 17 のUVスペクトル  
(濃度10ppm, 溶媒メタノール)

この 17 については、以前にCollinsらがエンバクの種子の成分avenanthramide Gとして記載しているが<sup>71)</sup>、その単離方法や物理化学データについては全く記載がない。エンバクにおけるストレス化合物として見いだされたのは、本研究がはじめてである。

#### 5-5 エリシターによる細胞膜機能傷害とファイトアレキシン誘導活性

5-2節で見いだされた、エンバクに対してエリシター活性を示す物質は、それらが、同じメカニズムでファイトアレキシンの誘導を引き起こしているとは考えにくいような、化学的に性質の異なるものから構成されている。前節までの検討により、その多様なエリシターが、その植物毒性やファイトアレキシン誘導時における類縁化合物の誘導パターンからみて、少なくともキチンオリゴマーとそれ以外の化合物の2つのグループに分類できる可能性を見いだした。しかし、キチン以外のグループ(victorin, キトサンオリゴマー, 銀イオン)には、依然としてそれらの物性に共通性を認めがたく、これらがどのようにしてファイトアレキシン誘導をもたらすのかについてはなお興味をもたれる。本節では、このグループのエリシターが共通してエンバク



に対して毒性を発現することに着目し、そのファイトアレキシン誘導との関連について検討した。

これまでにキトサンおよびvictorinは、いずれも細胞膜の透過性を増大させる作用をもつことが認められており、これらの化合物で処理した細胞では電解質の漏出が引き起こされる。<sup>84, 85)</sup> そしてこの透過性の異常が膜の機能破壊をもたらし、その結果細胞を死に至らせると考えられている。このような毒性を有するエリシターでは、図5-8のキトサンオリゴマーの場合のように、はじめは濃度の増加とともにファイトアレキシン誘導量が増加するが、ある一定以上の濃度では毒性が顕著に現れ、誘導は全く見られなくなる。ファイトアレキシン誘導活性を示す濃度範囲においては、キトサンオリゴマー、victorinいずれについてもその毒性の発現は肉眼的に顕著ではないものの、このときにも図5-9に示すように処理エンバク葉切片からの電解質漏出は確かに起こっており、既に細胞膜に部分的な傷害が生じていることが示唆された。キトサンとvictorinの植物細胞に対する毒性はカルシウムイオンによって抑制されることが知られている。<sup>84, 86)</sup> この抑制の原因としては、正電荷

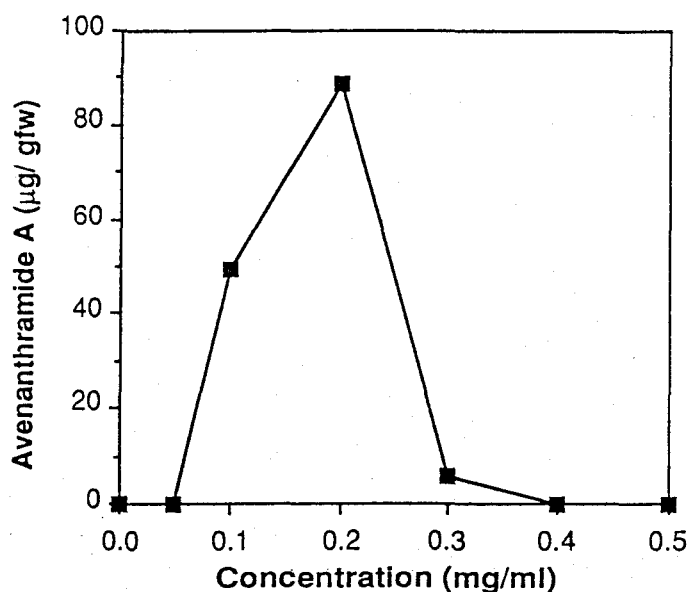


図5-8 キトサンペンタマーによるavenanthramide Aの誘導

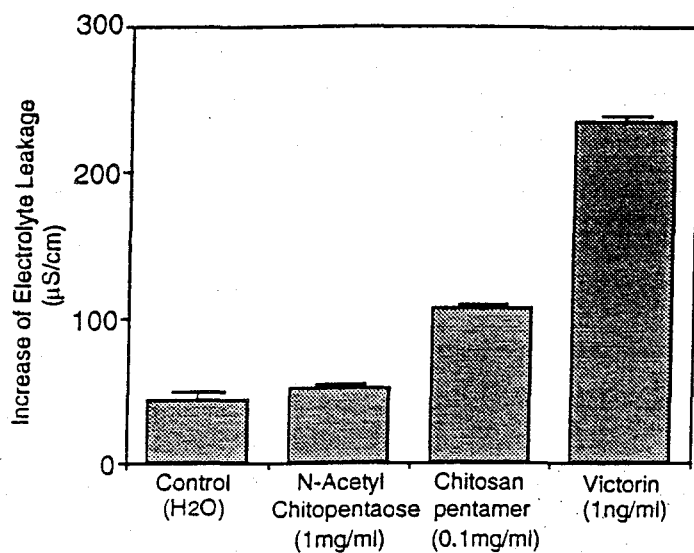


図5-9 エリシターによるエンバク葉身からの電解質の漏出

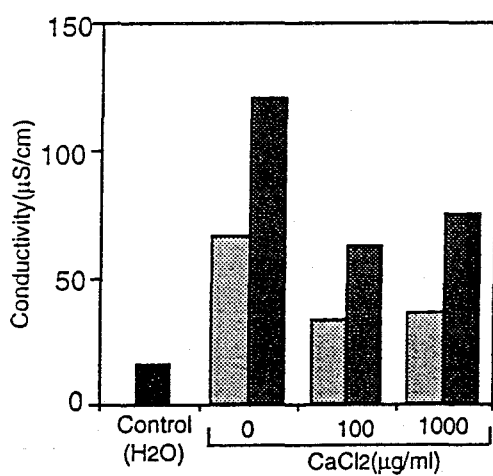


図5-10 Victorinがもたらす電解質漏出のカルシウムイオン添加による阻害  
Victorin濃度: (▨); 0.1ng/ml, (■); 10ng/ml

をもつカルシウムイオンの、負電荷をもつ細胞膜との相互作用による構造の安定化が考えられている。実際にvictorinについてこのカルシウムの電解質漏出抑制効果を調べた結果を図5-10に示す。このような知見をもとに、エリシター活性に及ぼすカルシウムイオン添加の効果を調べた。

結果を図5-11に示す。キチンオリゴマー以外の3種のエリシターの活性はいずれもカルシウムイオンの添加によって阻害され、ファイトアレキシンの誘導は  $100\mu\text{g}/\text{ml}$  ( $0.9\text{mM}$ ) の添加濃度でほぼ完全にみられなくなった。このうち銀イオンについては、細胞からの電解質漏出が測定できずその膜に対す

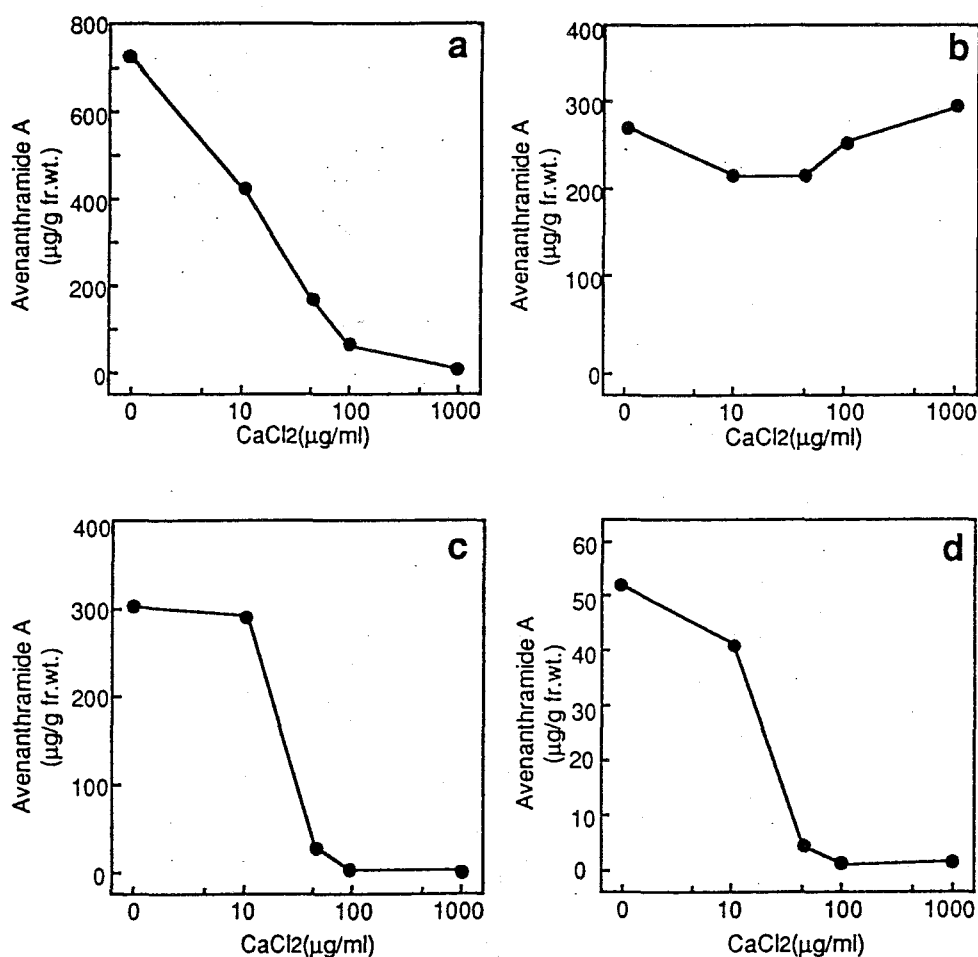


図5-11 Avenanthramide誘導におよぼすカルシウムイオン添加の効果

エリシター: a) victorin ( $1\text{ng}/\text{ml}$ ); b) キチンペンタマー ( $1\text{mg}/\text{ml}$ ); c) キトサンペンタマー ( $0.1\text{mg}/\text{ml}$ ); d) 銀イオン ( $\text{AgNO}_3$ ,  $10\mu\text{g}/\text{ml}$ )

る作用が明らかでなかったが、これによりキトサンオリゴマーやvictorinと同様の影響を与えていることが示唆された。以上の結果は、これらのエリシターによるエンバク細胞膜機能の傷害がファイトアレキシン誘導に関与しており、カルシウムイオンによりこの傷害が抑制されるとファイトアレキシンも誘導されなくなることを示している。言い換えれば、これらのエリシターは、メカニズムの詳細は不明であるが、それぞれが何らかの形で膜に傷害をおこし、これにより二次的あるいは間接的にファイトアレキシンの合成系が活性化されて、見かけ上同様の現象をもたらすのではないかと考えられる。

一方これら、3種のエリシターとは、その作用が異なると考えられたキチンオリゴマーについては、ファイトアレキシン誘導に対するカルシウムイオンの影響はみられなかった。

#### 5-6 キチンオリゴマーのエリシター活性

前節までで、キチンオリゴマーのエリシター作用は、エンバクに対する毒性を伴わず、その他のキトサンオリゴマー、victorinおよび銀イオンなどの作用とは異なることを明らかにした。また5-3で示したように、キチンオリゴマーにより誘導されるファイトアレキシン組成のパターンは、不親和性の冠さび菌を接種した場合の誘導パターンと類似しており、キチンオリゴマーが実際に感染の場合でもファイトアレキシン誘導に関与している可能性が考えられた。本節では、このように興味深いエリシター活性を示すキチンオリゴマーについて、ファイトアレキシン誘導における濃度依存性、時間変化およびオリゴマーの重合度との関係を調べた。

まず、処理するキチンオリゴマーとして重合度5のペンタマーを用い、その濃度とavenanthramide Aを指標としたファイトアレキシンの誘導量の関係を検討した。結果を図5-12に示す。avenanthramideの生成はキチンペンタマー0.05mg/mlの濃度から認められ、その後生成量は濃度の増加にしたがって増加して、1~5mg/mlでほぼ飽和に達する傾向を示した。

図5-13には、キチンペンタマーによるavenanthramide誘導の時間変化を示す。Avenanthramideは、処理液中に4時間後から検出され、18~24時間後に生成量が最高となった後、若干減少した。

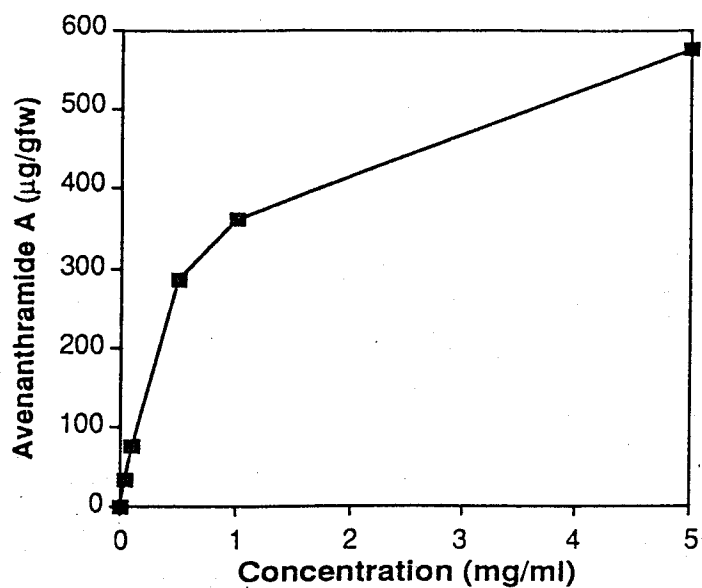


図5-12 キチンペンタマーによるavenanthramide Aの誘導

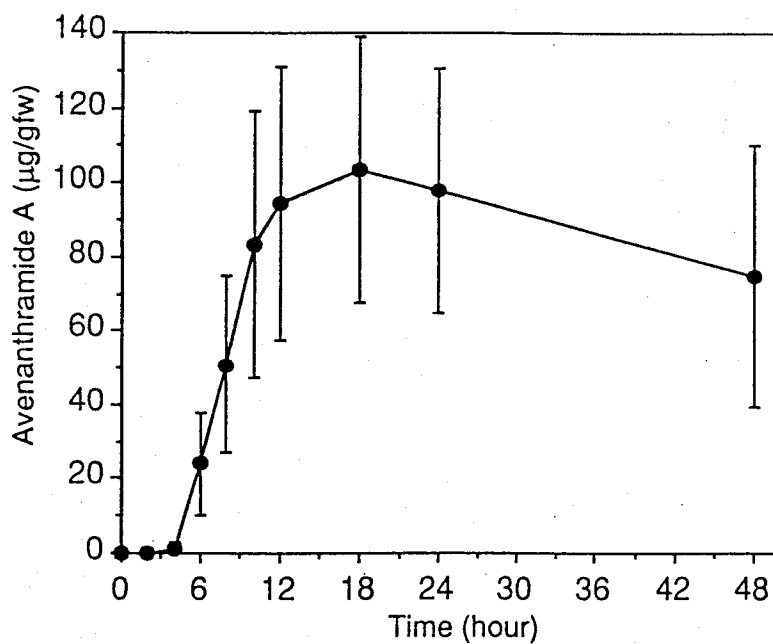


図5-13 キチンペンタマーによるavenanthramide Aの誘導の時間変化

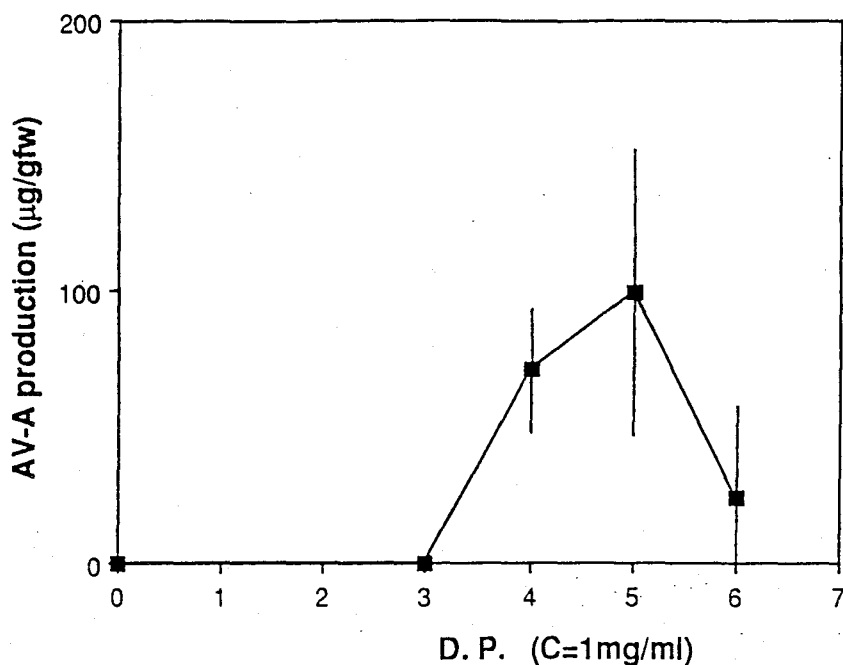


図5-14 Avenanthramide A誘導に及ぼすキチンオリゴマーの重合度の影響

以上の結果に基づいて、処理濃度を1mg/ml、処理時間を24時間としてキチンオリゴマーの重合度（3～6）と活性強度の関係を調べた。図5-14に示す通り、重合度3のトリマーには活性は認められず、重合度4から5のオリゴマーに強い活性が認められた。また重合度が6になると活性が低下し、キチンオリゴマーによるavenanthramideの誘導には、最適のサイズがあることが示唆された。

## 5-7 考察

エンバクにファイトアレキシン誘導活性を示す化合物を検索した結果、菌類の細胞壁構成成分である*N*-アセチルグルコサミンおよびグルコサミンのオリゴマー、銀やカドミウムなどの金属イオンに活性が認められた。またこれに加え以前から、ビクトリア葉枯病菌の生産する宿主特異的毒素victorinも、エンバクの品種Pc-2に対してのみ特異的にエリシター活性を示すことが知ら

れている。<sup>81)</sup> 以上のように物性が大きく異なるエリシターの作用を比較検討した結果、その植物毒性の有無、および誘導するファイトアレキシン組成の違いから、それらはキチンオリゴマーとそれ以外のグループに分類できるものと考えられた。

植物毒性を示す後者のグループのエリシターの誘導活性は、膜機能を安定化するカルシウムイオンの添加により阻害された。このことから、これらのエリシターはまずエンバクの膜機能に何らかの形で損傷を与え、それが引き金となって二次的にファイトアレキシンの誘導が起こるものと推察された。一方、キチンオリゴマーはエンバクの細胞からの電解質漏出を起こさず、またカルシウムイオンを添加してもそのファイトアレキシン誘導活性は影響を受けなかった。従って、この場合の誘導には膜の傷害は関与せず、与えたキチンオリゴマーがエンバクに本来備わっている「シグナル伝達機構」に直接刺激を与えて、ファイトアレキシン合成系を活性化している可能性が示唆された。この点については後に議論する。

以上の2つのグループのエリシターの作用の違いは、誘導されるファイトアレキシン組成の違いとなって観察された。特に膜の傷害が関与すると考えられるエリシターでは、これまで冠さび菌接種時にはみられなかった特徴的な化合物の誘導が認められ、その構造を解析した結果これを*N*-(4-hydroxycinnamoyl)-4-hydroxyanthranilic acid (avenanthramide G, 17) と同定した。この化合物は細胞膜の傷害によりもたらされる一種のストレス物質であるが、これをよく誘導するvictorinの生産菌に対しては、ほとんど生育阻害作用を示さず(データは示していない)、防御物質としての機能はほとんど期待できないものと考えられる。前章でエンバクにおける被誘導性化合物としてavenanthramide A(12), B(15)およびL(16)の構造を明らかにしたが、これらはいずれも5-hydroxyanthranilic acidを構成要素としているのに対し、avenanthramide Gでは4-hydroxy体を構成要素としているのが特徴的である。avenanthramideと類似の構造のファイトアレキシンをもつカーネーションでは、この4-hydroxyanthranilic acidを構成要素としているものも多く見つかっているが、なぜエンバクではエリシターの作用のちがいに誘導されるアントラニル酸成分が変化するのか、今後の興味深い検討課題であると思われる。なおエンバクでも、種子の成分として4-hydroxyanthranilic acidのクマル酸抱合体が見つかっている。<sup>70)</sup>

誘導されるファイトアレキシンの組成パターンから見ると、膜傷害を伴わないキチンオリゴマーにより誘導されるパターンと不親和性冠さび菌接種時に得られるパターンとの間にはよい一致が観察された。この結果は、実際の感染の場合でも、キチンのオリゴマーがファイトアレキシンの誘導に関わっている可能性を示すものである。ここで、キチンオリゴマーの菌細胞壁からの切り出しには、エンバクの細胞間隙に存在するエンド型のキチナーゼが関与していると考えられ<sup>87, 88)</sup>、この活性は実際に冠さび菌の感染したエンバク葉で認められている。これに関連して、キチンオリゴマーによるファイトアレキシンの誘導は5-6節で示したように処理後18~24時間で最高となるのに対し、冠さび菌接種時には通常、誘導が顕著になるのは接種後48時間後位からである。この時間差は、病原菌と植物の相互作用部位でオリゴマーの切り出し過程が存在することを示唆している。以上のことを考慮に入れて推定される、エンバクのファイトアレキシンの誘導機構を図5-15に模式的に示す。

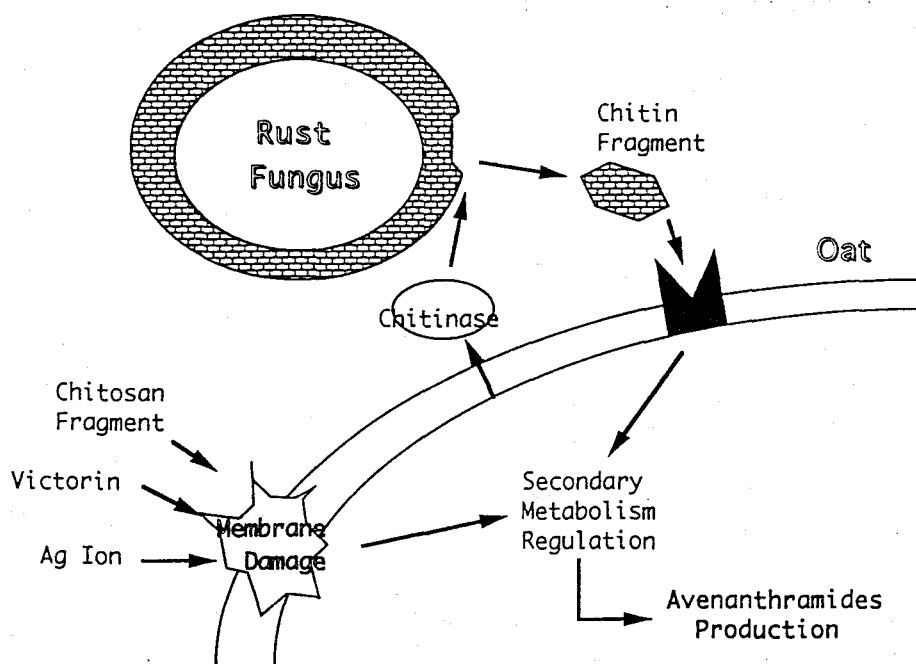


図5-15 エンバクにおけるavenanthramide類の推定誘導機構



キチンオリゴマーのエリクター活性は、イネでも認められている。<sup>89)</sup> またイネの培養細胞では、可溶性のキチン断片によって、キチナーゼの誘導がおこることが示されており<sup>90)</sup>、相互作用の場でキチンオリゴマーの「増幅」が行われている可能性もある。イネでは、重合度6~8のオリゴマーが高い活性を示すが<sup>89)</sup>、これはエンバクの場合の最適値4~5と若干異なっている。キチンオリゴマーの作用としては他に、コムギやニンジンにおけるリグニン化の誘導<sup>91, 92)</sup>、メロンにおけるキチナーゼの誘導<sup>93)</sup>などが認められている。一方、双子葉植物でエリクターとしての有効性が示されている $\beta$ -1,3あるいは1,6グルカンは、先に示したようにエンバクには無効で、他のイネ科植物を見てもあまり活性が検討されていない。キチンと $\beta$ -1,3グルカンは菌類の細胞壁の2大主要構成成分と言えるが、エンバクを含む単子葉植物は菌類の認識に関して、前者のみを対象として利用しているようである。

これまで、エンバクの病害抵抗性に関係するファイトアレキシン誘導に、キチンオリゴマーが何らかの役割を果たしているかもしれないことを考察してきた。しかし、第4章で述べたように、エンバク冠さび病では、品種-レース間の親和・不親和性にそれぞれの遺伝子に支配された明確な特異性が観察されている。キチンオリゴマーは、その物性の単純さからみて、病原菌のレース間の差異を説明するには極めて不十分であり、特異性の決定に関与しているとは考えにくい。従って、実際の感染の場では、より決定的な役割を果たすエリクターが存在するものと考えるべきであろう。近年、そのような特異性の決定に関わる化学的因子が、いくつかの植物病害の系で同定されたことは緒言で触れたとおりであり、いわゆる「遺伝子対遺伝子仮説」<sup>94)</sup>が実証されつつある。本エンバク冠さび病の系についても、種々の実験を進める上での困難はあるが、この「特異的エリクター」を明らかにすることは今後の大きな研究課題であると言えるだろう。ただ、感染時には、植物側の反応は一樣でなく、菌と直接相互作用する部位の細胞では「過敏感死」と呼ばれる細胞死がおこり、ファイトアレキシンが合成されるのはその周辺の生きた組織においてであることを考えると、それぞれの反応に関わる因子が異なることが十分予想される。すなわち、相互作用部位では主にキチンオリゴマーを切り出すメカニズムが活性化され、その生成物がシグナルとなって周辺に伝わり、ファイトアレキシン合成が開始されるのではないだろうか。

以上本章の検討により、キチンオリゴマーはその作用からみて、エンバク

におけるファイトアレキシン合成系およびその活性化機構を解析するための興味深いプローブであると結論できる。また、これ以外にもイネでキチナーゼ誘導作用がみられたように、種々の代謝調節活性を有していることも予想される。これに関連してこれまでに、植物細胞壁の構成成分キシロースのオリゴマーがホルモン様の活性をもつことが示されており、他にオリゴガラクトシュロン酸にもエリシター活性が認められている。<sup>95)</sup> このようにキチンオリゴマーを含むオリゴサッカライド類には、単に防御上での機能のみならず、植物の生長や分化、形態形成など、未知の興味深い植物機能調節活性が期待できる。このことを念頭におきながら、今後さらに検討をおこなっていきたいと考える。

## 5-8 実験の部

実験材料：エンバクは品種勝冠1号またはPc-2を用い、バーミキュライト上で、25℃人工照明の常光下で生育させ、播種後7日の第1葉を実験に供した。エリシターとして用いた、キチンおよびキトサンのオリゴマーは生化学工業より購入した。Victorin(D)は神戸大学農学部真山先生より供与していただいた。

エリシター活性の検定：エンバクの第1葉の裏表皮を除去し、長さ約2cmの切片として被験エリシター水溶液に浮かべ、人工照明下25℃で保持した。24時間後この処理液をHPLC（カラム、Wakosil II 5C18 4.6×150mm；移動相、メタノール-1%リン酸水溶液(1/1)、0.8ml/min；検出、UV340nm）で分析しavenanthramide類の生成を検出した。エリシターを幼苗に直接噴霧処理した際には、葉身に2%酢酸水を加え、沸騰湯浴中で10分間加熱して抽出し、同じHPLC条件で分析した。

電解質漏出の測定：エリシター処理後24時間における処理液の電気伝導度を堀場製作所製伝導度計C-172により測定した。カルシウムイオン添加の影響を調べる場合には、文献の方法<sup>86)</sup>に従い、処理後12時間から24時間の伝導度の増加量で漏出を評価した。

ストレス化合物 17 の調製：25℃に設定した人工気象器内で生育させた播種後7日のエンバク幼苗（品種：勝冠1号）に硝酸銀水溶液（1000ppm）を噴霧した。2日後、その地上部（700g）を刈り取り、メタノールで抽出し、抽出

液を濾過後、減圧濃縮した。得られた濃縮物をメタノール-水 (80/20) に溶解し、ヘキサンとの分配による洗浄をおこなった後、さらに1%酢酸水で約4倍に希釈しODSカラム (Cosmosil 75C18-OPN, 4×25cm) にアプライした。カラムはまず、メタノール-水-酢酸 (80/19.8/0.2) で洗浄し、ついで同 (50/49.5/0.5) で溶出した。溶出液を減圧濃縮後、HPLC (カラム, Cosmo-sil 5C18 AR, 20×250mm; 移動相, メタノール-水-酢酸 (55/44.55/0.45, 流速6 ml/min, 検出, UV 280nm) により精製を行って、黄色粉末状固形物 (15.7 mg) を得た。その物理化学データは以下に示す通りである。

UV  $\lambda_{\max}(\text{CH}_3\text{OH})\text{nm}$ : 326, 259, 217. IR  $\nu_{\max}(\text{KBr})\text{cm}^{-1}$ : 3320, 1600, 1225. Thermospray-LC-MS: 300 ( $\text{M}+\text{H}^+$ ), 282, 256.  $^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{OD})\delta$ : 6.50 (1H, d,  $J=15.8\text{Hz}$ ), 6.53 (1H, dd,  $J=9.0, 2.5\text{Hz}$ ), 6.81 (2H, d,  $J=8.8\text{Hz}$ ), 7.49 (2H, d,  $J=8.8\text{Hz}$ ), 7.59 (1H, d,  $J=15.8\text{Hz}$ ), 7.97 (1H, d,  $J=9.0\text{Hz}$ ), 8.19 (1H, d,  $J=2.5\text{Hz}$ ).  $^{13}\text{C-NMR}(\text{DMSO}-d_6)\delta$ : 105.7, 108.7, 109.6, 115.6, 118.9, 125.3, 129.7, 133.2, 140.9, 143.0, 159.2, 161.7, 163.9, 169.5

17 のアセチル化: 精製した 17 (1mg) を無水酢酸 (250 $\mu\text{l}$ ) とピリジン (250 $\mu\text{l}$ ) の混合液に加え48時間室温で放置した。反応液を濾過後、窒素気流で濃縮し、残渣を分取シリカゲルTLC (ベンゼン-ジエチルエーテル(3:1)) で精製してアセチル化物を得た。EI-MS  $m/z$ : 365 ( $\text{M}^+$ ), 323, 281, 280, 253, 252, 236, 147, 135, 119, 106, 91, 43.  $^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{OD})\delta$ : 2.32 (3H, s), 2.37 (3H, s), 6.72 (1H, d,  $J=16.0\text{Hz}$ ), 7.16 (2H, d,  $J=8.3\text{Hz}$ ), 7.26 - 7.38 (2H, m), 7.61 (1H, d,  $J=8.3\text{Hz}$ ), 7.86 (1H, d,  $J=16.0\text{Hz}$ ), 8.23 (1H, d,  $J=8.6\text{Hz}$ ). IR  $\nu_{\max}(\text{KBr})\text{cm}^{-1}$ : 1755, 1198.

17 の加水分解: 精製した 17 を2N NaOH水溶液に溶解し、12時間加熱還流した。反応液を中和し、濾過した後、濾液をSEP-PAK C18カートリッジを用いて脱塩し、次いでグラジエントHPLC (カラム, Wakosil-II 5C18 HG 4.6 × 150mm; 移動相, 0.1%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ を含む20% MeOHを5分間流した後、25分でメタノール含量を80%まで増加させる, 流速, 0.8ml/min; 検出, UV 280nm) により分析した。さらに検出されたピークに相当するカラムからの溶出液は分取して、UVスペクトルを測定した。4-Hydroxycinnamic acidは保持時間16.2分に検出され、UVスペクトル $\lambda_{\max}(\text{MeOH})$  312および300 (sh) nmを与えた。

合成: 4-Hydroxyanthranilic acid (21). ReinhardとMaternの方法<sup>82)</sup>に

従い、2,4-dinitrobenzoic acid ( 18, 5g)をammonium sulfide (15%水溶液, Aldrich) を用いて還元し、2-nitro-4-aminobenzoic acid ( 19 )を得た。生成物 19 は文献記載の方法に従って抽出した後、弱酸性条件下 (pH 5) で酢酸メチル層に転溶させた。減圧濃縮後、酢酸-水から再結晶をおこない褐色の粉末状結晶を57%収率で得た。mp 236.5-239.5°C. EI-MS m/z: 182(M<sup>+</sup>), 165, 136, 108, 80. <sup>1</sup>H-NMR(CD<sub>3</sub>OD) δ: 6.75 (1H, d, J=9.3Hz), 6.76 (1H, s), 7.66 (1H, d, J=9.3Hz)

次に 19 (1.82g)をDrainらの方法<sup>83)</sup>に従い、そのジアゾニウム塩を経て4-hydroxy-2-nitrobenzoic acid ( 20 )に変換した。クロロフォルム-メタノール (1:1) を展開溶媒とするシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製を行って、20 の褐色結晶を得た。(558mg, 収率31.6%), mp 230-232°C. EI-MS m/z: 183 (M<sup>+</sup>), 139, 137, 109, 81. <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 7.03 (1H, d, J =8.5Hz), 7.08 (1H, s), 7.77 (1H, d, J=8.5Hz)

さらに 20 のニトロ基を接触還元によりアミノ基へ変換した。20 (558mg) のエタノール溶液(12ml)に酸化白金(20mg)を加え、水素雰囲気下で3時間撹拌した。濾過および濃縮の後、残渣を水から結晶化させ、HPLC (カラム, Cosmosil 5C18 AR20×250mm; 移動相, メタノール-水-酢酸 (10:98.1:0.9); 流速, 6ml/min; 検出, UV 280nm)で精製して 21 の針状晶 (271mg, 収率58.2%)を得た。mp 154°C (decomp. 昇華性のため測定は困難で、観測値は加熱速度に依存して変動した)

Anal. Found: C, 54.71; H, 4.47; N, 9.04%. Calcd. for C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>O<sub>3</sub>N: C, 54.90; H, 4.46; N, 9.15%. UV λ<sub>max</sub> (MeOH) nm (ε): 320 (6500), 260 (13000), 225 (43000). EI-MS m/z: 153(M<sup>+</sup>), 135, 108, 107. <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 6.09(1H, d, J=9.2Hz), 6.12 (1H, s), 7.69 (1H, d, J=9.2Hz).

N-(4'-hydroxycinnamoyl)-4-hydroxyanthranilic acid, Avenanthramide G  
(17) 前章のavenanthramide A( 12 )の合成と同様に調製した4-acetoxy-cinnamic acidchloride (1.7 gの 4-acetoxycinnamic acidから得たもの) を無水アセトン(12.3ml) に懸濁させ、21 (187.6mg) の無水ピリジン溶液 (12.3ml)を加えた。反応液を20分間還流加熱し、放冷後減圧濃縮およびアセトン-水(80:20, v/v) による洗浄を数回繰り返した。残渣はさらにアセトン-酢酸-水(80:10:10) に懸濁して一夜放置し、減圧濃縮後アセチル基を除去するためにメタノール-水-アンモニア水 (50:40:10)中で30分間加熱還

流した。反応後濃縮して得られた油状物をメタノール-1%酢酸水から結晶化させ、さらに同じ溶媒系で再結晶を行って 17 の無色結晶を得た。mp 290-291°C. Anal. Found: C, 63.55; H, 4.53; N, 4.67%. Calcd for  $C_{16}H_{13}O_5N \cdot 1/4MeOH$ : C, 63.51; H, 4.56; N, 4.56%. Thermospray LC-MS  $m/z$ : 300 ( $M+H^+$ ), 282, 256. EI-MS  $m/z$ : 299 ( $M^+$ ), 281, 181, 147, 119, 91. UV  $\lambda_{max}$  (MeOH) nm ( $\epsilon$ ): 328 (35000), 304sh (25000), 264 (16000), 220 (22000). IR  $\nu_{max}$  (KBr)  $cm^{-1}$ : 3320, 1600, 1225.  $^1H$ -NMR ( $CD_3OD$ )  $\delta$ : 6.51 (1H, d,  $J=15.8Hz$ ), 6.53 (1H, dd,  $J=8.8, 2.5Hz$ ), 6.81 (2H, d,  $J=8.4Hz$ ), 7.49 (2H, d,  $J=8.4Hz$ ), 7.60 (1H, d,  $J=15.8Hz$ ), 7.97 (1H, d,  $J=8.8Hz$ ), 8.21 (1H, d,  $J=2.5Hz$ ).  $^{13}C$ -NMR ( $DMSO-d_6$ )  $\delta$ : 106.2, 107.4, 110.1, 115.9, 119.1, 125.6, 130.1, 133.3, 141.4, 143.5, 159.6, 162.5, 164.3, 169.9

## 第6章 まとめ

以上3つのイネ科植物-病原菌の系で、その相互作用に関わる化学物質について検討を加えた結果、次のようなことを明らかにすることができた。

1. 葉枯病菌 *Bipolaris bicolor* の生産する植物毒素として4種の cochlioquinone 類縁化合物を同定した。これらの化合物はいずれも宿主植物の生育を低濃度で阻害し、同菌の病原性発現にとって重要な役割を果たすものと考えられた。
2. オオムギのうどんこ病抵抗性に関与する化学物質解明の手掛かりを得るため、そのストレス物質を検索し、誘導性の抗菌性物質として、12-oxo-10,15-phytodienoic acid を、また蛍光性物質として tryptamine を同定した。これら2つの化合物は、いずれもうどんこ病菌の孢子発芽を阻害し、さらに後者については、その菌接種時のオオムギ葉内蓄積量とうどんこ病抵抗性強度との間に相関が認められ、ファイトアレキシン様の機能を有するものと推察された。
3. エンバクのファイトアレキシンについて、化学構造の再検討をおこない、それらが従来考えられてきたようなベンゾキサジノン環をもつ化合物でなく、p-クマル酸誘導体とアントラニル酸誘導体の縮合したアミド化合物であることを明らかにした。あわせて、副成分として新規物質 avenanthramide L を同定することができた。
4. エンバクに対してエリシター活性を示す物質を検索し、活性の認められた化合物の作用を比較検討した。この結果、エリシターはその作用からみて、少なくとも2種類に分類できることがわかった。そのうち、キチンのオリゴマーは、実際の冠さび菌接種時と同様の反応をエンバクにもたらすことが判明し、今後のファイトアレキシン誘導機構解明のための有用なプローブであると考えられた。
5. エンバクに対してエリシター活性の認められた化合物のうち、細胞膜の

傷害作用を伴うものは、処理時に冠さび菌接種時にはみられない特徴的な化合物を誘導することが認められた。その成分を単離して構造解析を行い、*N*-(4-hydroxycinnamoyl)-4-hydroxyanthranilic acidと同定した。

今後これらの物質の動態や作用性を詳細に解析し、他の系での結果と比較検討することにより、イネ科植物の疾病の成立要因や宿主決定機構についての理解がさらに深まるものと期待される。

## 引用文献

- 1) K. O. Müller and H. Börger, Arb. Biol. Reichsanstalt. Landw. Forstw. Berlin, 23: 189 (1940)
- 2) K. O. Müller, Aust., J. Biol. Sci., 11: 275 (1958)
- 3) J. D. Paxton, Plant Disease, 64: 734 (1980)
- 4) J. D. Paxton, Phytopathol. Z., 101: 106 (1981)
- 5) N. T. Keen, Physiol. Plant. Pathol., 1: 265 (1971)
- 6) J. A. Bailey and B. J. Deverall, Physiol. Plant. Pathol., 1: 435 (1971)
- 7) M. Yoshikawa, K. Yamauchi, and H. Masago, Physiol. Plant. Pathol., 12: 73 (1978)
- 8) J. A. Bailey, P. M. Rowell, and G. M. Arnold, Physiol. Plant. Pathol., 17: 329 (1980)
- 9) S. Mayama, H. Matsuura, H. Iida, and T. Tani, Physiol. Plant Pathol., 20: 189 (1982)
- 10) R. P. Scheffer and R. S. Livingston, Science, 223: 17 (1984)
- 11) T. Shiraishi, K. Saitoh, H.-M. Kim, T. Kato, M. Tahara, H. Oku, and T. Yamada, Plant Cell Physiol., 33: 663 (1992)
- 12) M. R. Pope, L. M. Ciuffetti, H. W. Knoche, D. McCrery, J. M. Daly, and L. D. Dunkle, Biochemistry, 22: 3502 (1983)
- 13) T. J. Wolpert, V. Macko, W. Acklin, B. Jaun, J. Seibl, J. Meili, and D. Arigoni, Experientia, 41: 1524 (1985)
- 14) Y. Kono, S. Takeuchi, A. Kawarada, J. M. Daly, and H. W. Knoche, Tetrahedron Lett. 21: 1537 (1980)
- 15) Y. Suzuki, L. W. Coleman, J. M. Daly, Y. Kono, H. W. Knoche, and S. Takeuchi, Phytochemistry, 26: 687 (1987)
- 16) T. J. Wolpert, D. A. Navarre, D. L. Moore, and V. Macko, Plant Cell, 6: 1145 (1994)
- 17) J. R. Carruthers, S. Cerrini, W. Fedeli, C.G. Casinovi, C. Galeffi, A. M. Torracca Vaccaro, and A. Scala, Chem. Comm., 1971: 164
- 18) L. Canonica, C. G. Casinovi, A. Fiecchi, C. Galeffi, G. B. Marini Bettolo, A. Scala, and A. M. Vaccaro Torracca, Gazzeta Chimica Italiana, 106: 147 (1976)
- 19) L. Canonica, M. G. Beretta, L. Colombo, C. Gennari, B. M. Ranzi and C. Scolastico, J. C. S. Perkin I, 1980: 2686



- 20) K. D. Barrow and W. S. Murphy, J. C. S. Perkin I. 1972: 2837
- 21) P. M. Scott and J. W. Lawrence, Can. J. Microbiol., 14: 1015 (1968)
- 22) C. Huber, W. A. Court, J. P. Devlin, O. E. Edwards, and P. M. Scott, Tetrahedron Lett., 1974: 2545
- 23) S. Takeuchi, J. Uzawa, H. Sato, and H. Yonehara, Tetrahedron Lett., 1977: 2943
- 24) C. H. Lim, H. Ueno, H. Miyoshi, H. Miyagawa, and T. Ueno, in preparation.
- 25) U. Herz, W. Schröder, A. Liddell, C. J. Leaver, A. Brennicke, and L. Grohmann, J. Biol. Chem., 269: 2263 (1994)
- 26) H. Ueno, H. Miyoshi, K. Ebisui, and H. Iwamura, Eur. J. Biochem., 225: 411 (1994)
- 27) P. B. Sweetser, G. S. Schow, and J. M. Hutchison, Pestic. Biochem. Physiol., 17: 18 (1982)
- 28) D. J. Robeson, G. A. Strobel, G. K. Matsumoto, E. L. Fisher, M. H. Chen, and J. Clardy, Experientia, 40: 1248 (1984)
- 29) S. O. Duke, Rev. Weed Sci., 2: 15 (1986)
- 30) G. M. Sheldrick, SHELXS86, program for the solution of crystal structures, University of Göttingen, Germany (1986)
- 31) N. Tanaka, Y. Yamanouchi, Y. Katsube, and T. Ashida, J. Crystallogr. Soc. Jpn. 31: 27 (1989)
- 32) Y. Ashida, FMLS, The Universal Crystallographic Computing System - Osaka, The Computing Center, Osaka University, Japan (1979)
- 33) M. S. MacCoy and A. H. Ellingboe, Phytopathology, 56: 683 (1966)
- 34) R. S. Slesinski and A. H. Ellingboe, Phytopathology, 59: 1833 (1969)
- 35) R. S. Slesinski and A. H. Ellingboe, Phytopathology, 60: 1068 (1970)
- 36) S. Mayama and J. Shishiyama, Ann. Phytopathol. Soc. Jpn., 42: 618 (1976)
- 37) S. Mayama and J. Shishiyama, Physiol. Plant Pathol., 13: 347 (1978)
- 38) H. Toyoda, S. Mayama, and J. Shishiyama, Phytopathol. Z., 92: 125 (1978)
- 39) 豊田秀吉, 植物病害研究, 9: 69 (1983)
- 40) O. Kodama, T. Suzuki, J. Miyakawa, and T. Akatsuka, Agric. Biol. Chem., 52: 2649 (1988)
- 41) O. Kodama, J. Miyakawa, T. Akatsuka, and S. Kiyosawa, Phytochemistry, 31: 3807 (1992)
- 42) S. W. Baertschi, C. D. Ingram, T. M. Harris, and A. R. Brash,

Biochemistry, 27: 18 (1988)

- 43) D. C. Zimmerman and P. Feng, *Lipids*, 13: 313 (1978)
- 44) B. A. Vick and D. C. Zimmerman, *Plant Physiol.*, 75: 458 (1984)
- 45) B. A. Vick and D. C. Zimmerman, *Plant Physiol.*, 69: 1103 (1982)
- 46) P. E. Statswick, *Plant Physiol.*, 99: 804 (1992)
- 47) W. X. Li, O. Kodama, and T. Akatsuka, *Agric. Biol. Chem.*, 55: 1041 (1991)
- 48) R. Rakwal, O. Kodama, and T. Akatsuka, 第19回日本農業学会大会 (札幌) 講演要旨集, p.36 (1994)
- 49) S. Mayama, T. Tani, Y. Matsuura, T. Ueno, K. Hirabayashi, H. Fukami, H. Mizuno, and H. Irie, *J. Chem. Soc. Jpn.*, 5: 697 (1981)
- 50) A. Stoessl, *Can. J. Botany*, 45: 1745 (1967)
- 51) T. A. Smith and G. R. Best, *Phytochemistry*, 17: 1093 (1978)
- 52) R. L. Evans and D. J. Plank, *Ann. Appl. Biol.*, 89: 332 (1978)
- 53) D. Gross, H. Lehmann, and H-R. Schütte, *Z. Pflanzenphysiol.*, 63: 1 (1970)
- 54) E. A. Schneider, R. A. Gibson, and F. Wightman, *J. Exp. Botany*, 23: 152 (1972)
- 55) L. Overland, *Am. J. Bot.*, 53: 423 (1966)
- 56) D. L. Liu and J. V. Lovett, *J. Chem. Ecol.*, 19: 2231 (1993)
- 57) G. E. Zúñiga and L. J. Corcuera, *Entomol. Exp. Appl.*, 40: 259 (1986)
- 58) H. M. Niemeyer, *Phytochemistry*, 27: 3349 (1988)
- 59) H. Oku, S. Ouchi, T. Shiraishi, Y. Komoto, and K. Oki, *Ann. Phytopath. Soc. Jpn.*, 41: 485 (1975)
- 60) J. Sebesta and D. E. Harder, *Plant Disease*, 67: 56 (1983)
- 61) S. Mayama, T. Tani, Y. Matsuura, T. Ueno, and H. Fukami, *Physiol. Plant Pathol.*, 19: 217 (1981)
- 62) S. Mayama, T. Tani, T. Ueno, K. Hirabayashi, T. Nakashima, H. Fukami, Y. Mizuno, and H. Irie, *Tetrahedron Lett.*, 22: 2103 (1981)
- 63) L. Crombie and J. Mistry, *Tetrahedron Lett.*, 31: 2647 (1990)
- 64) F. W. Collins, *J. Agric. Food Chem.*, 37: 60 (1989)
- 65) M. Bouillant, J. Favre-Bonvin, and P. Ricci, *Tetrahedron Lett.*, 24: 51 (1983)
- 66) M. Ponchet, J. Martin-Tanguy, A. Marais, and A. Poupet, *Phytochemistry*, 23: 1901 (1984)

- 67) M. Ponchet, J. Favre-Bonvin, M. Hauteville, and P. Ricci, *Phytochemistry*, 27: 725 (1988)
- 68) G. J. Niemann, J. Liem, J. B. M. Pureveen, and J. J. Boon, *Phytochemistry*, 30: 3923 (1991)
- 69) T. Ueno, K. Hirabayashi, H. Fukami, S. Mayama, T. Tani, Y. Mizuno, and H. Irie, *Symposium Papers, 24th Symposium on The Chemistry of Natural Products*, Osaka, 1981, p.143
- 70) F. W. Collins, D. C. McLachlan, and B. A. Blackwell, *Cereal Chemistry*, 68: 184 (1991)
- 71) F. W. Collins and W. J. Mullin, *J. Chromatogr.*, 445: 363 (1988)
- 72) J. K. M. Roberts, D. Wenner, P. M. Ray, and O. Jardetzky, *Plant Physiol.*, 69: 1344 (1982)
- 73) S. Mayama and T. Tani, *Physiol. Plant Pathol.*, 21: 141 (1982)
- 74) D. Cartwright, P. Langcake, R. J. Pryce, D. P. Leworthy, and J. P. Ride, *Nature*, 267: 511 (1977)
- 75) 吉川正明, 植物感染生理学, 文永堂出版, p.134, 1990
- 76) I. M. J. Schottens-Toma and P. J. G. M. De Wit, *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 33: 59 (1988)
- 77) S. L. Midland, N. T. Keen, J. Sims, M. M. Midland, M. M. Stayton, V. Burton, M. J. Smith, E. P. Mazzola, K. J. Graham, and J. Clardy, *J. Org. Chem.*, 58: 2940 (1993)
- 78) I. Oguni, K. Suzuki, and I. Uritani, *Agric. Biol. Chem.*, 40: 1251 (1976)
- 79) N. Doke, *Physiol. Plant Pathol.*, 23: 345 (1983)
- 80) M. R. Stab and J. Ebel, *Arch. Biochem. Biophys.*, 257: 416 (1987)
- 81) S. Mayama, T. Tani, T. Ueno, S. L. Midland, J. J. Sims, and N. T. Keen, *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 29: 1 (1986)
- 82) K. Reinhard and U. Matern, *Arch. Biochem. Biophys.*, 275: 295 (1989)
- 83) D. J. Drain, D. D. Martin, B. W. Mitchell, D. E. Seymour, and F. S. Spring, *J. Chem. Soc.*, 1949: 1498
- 84) D. H. Young, H. Kohle, and H. Kauss, *Plant Physiol.*, 70: 1449 (1982)
- 85) K. Akimitsu, L. P. Hart, J. D. Walton, and R. Hollingworth, *Plant Physiol.*, 98: 121 (1992)
- 86) B. Doupnik, Jr., *Phytopathology*, 58: 215 (1968)
- 87) W. Fink, M. Liefeland, and K. Mendgen, *Plant Physiol.*, 88: 270 (1988)
- 88) W. Fink, M. Liefeland, and K. Mendgen, *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 37:

309 (1990)

- 89) A. Yamada, N. Shibuya, O. Kodama, and T. Akatsuka, Biosci. Biotech. Biochem., 57: 405 (1993)
- 90) Y.-Y. Ren and C. A. West, Plant Physiol., 99: 1169 (1991)
- 91) M. S. Barber, R. E. Bertram, and J. P. Ride, Physiol. Mol. Plant Pathol. 34: 3 (1989)
- 92) F. Kurosaki, N. Tashiro, and A. Nishi, Plant Cell Physiol., 29: 527 (1988)
- 93) D. Roby, A. Gadelle, and A. Toppan, Biochem. Biophys. Res. Comm. 143: 885 (1987)
- 94) H. H. Flor, Adv. Genet., 8: 29 (1956)
- 95) 林 隆久, 化学と生物, 29: 150 (1991)

## 謝辞

本研究をおこなうにあたり、ご指導と激励を賜りました京都大学農学部農薬研究施設、桑原保正教授に篤くお礼申し上げます。また、研究をおこなう機会と、数々のご援助をいただきました同農芸化学科、上野民夫教授に感謝の意を表します。

研究を進めるにあたっては、農薬研究施設の永井伸治、戸田洋志、西本泰三、石原 亨の各氏、ならびに阪南大学助教授、鶴嶋 鉄博士の多大なるご協力を得ました。ここに心からお礼申し上げます。また、貴重なご助言をいただいた農薬施設の西田律夫助教授、佐久間正幸博士、津田盛也助教授、田中千尋助手、ならびに同研究施設の皆様に厚くお礼申し上げます。

研究に使用した生物試料を提供していただくとともに、ご助言とご指導を賜った京都大学名誉教授（現近畿大学農学部教授）獅山慈孝および神戸大学農学部助教授真山滋志の両先生に、深く感謝致します。さらに、各種機器分析にあたりご助力を頂いた、京都大学薬学部、井上謙一郎博士、京都大学化学研究所大嶺恭子氏、大阪大学蛋白質研究所佐藤 衛博士、京都工芸繊維大学八十川伯朗氏、山岡亮平助教授の各氏にお礼申し上げます。

最後に、これまで終始さまざまな分野にわたる貴重なご助言とあたたかい激励を賜りました京都大学名誉教授、藤田稔夫、深海 浩の両先生に心からの感謝の意を表します。